

Neue Auxiliare für die Peptidfragmentverknüpfung

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biochem. Christian Haase
geboren am 22.09.1979 in Greifswald

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Oliver Seitz
2. Prof. Dr. Jürgen Liebscher
3. Prof. Dr. Valentin Wittmann

eingereicht am: 9. November 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2004 bis November 2009 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie, Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Meinen Kindern – Sterne in dunkelster Nacht

Abstract

Keywords: auxiliary, native chemical ligation, peptide fragment condensation, desulfurization

In this thesis approaches for convergent synthesis of peptides have been developed. In the extended native chemical ligation so far space demanding auxiliaries encumbered challenging condensations. Furthermore the required drastic acidolytic cleavage conditions were furthermore incompatible with many post-translational modifications. In the thesis a nouvelle less space demanding scaffold was scrutinized which allowed a milder basic cleavage. Therefore a small electron-accepting substituent was introduced that enabled the induction of an elimination reaction liberating the target peptide after the peptide ligation had taken place. Furthermore the applicability of the commercially available penicillamine as precursor of valine in the ligation-desulfurization strategy could be demonstrated. Finally the ligation with sequence internal cysteines was scrutinized. Herein it could be shown that certain peptides with cysteine in a distinctive position of the sequence preferable reacted in thioester-based condensation reactions.

Zusammenfassung

Schlüsselworte: Auxiliar, Native chemische Ligation, Peptidfragmentkondensation, Entschwefelung

In dieser Dissertation wurden Verfahren für die konvergente Synthese von Peptide entwickelt. Für die erweiterte native chemische Ligation kamen bisher raumbeanspruchende Auxiliare zum Einsatz, die anspruchsvolle Ligationen behinderten. Zudem waren die drastischen säure-basierten Abspaltbedingungen mit vielen post-translationalen Modifikationen nicht vereinbar. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Auxiliargerüst mit geringerem Raumanspruch untersucht, dass eine erheblich mildere Abspaltung unter basischen Bedingungen ermöglichte. Dazu wurde ein kleiner Elektronenakzeptorsubstituent eingeführt, durch den nach der Ligation eine das Zielpeptid freisetzende Eliminierungsreaktion induziert werden konnte. Weiterhin konnte die Verwendung des kommerziell verfügbaren Penicillamins als Vorläufer in der Ligations-Entschwefelungs-Strategie demonstriert werden. Abschließend wurde die Ligation mit sequenz-internem Cystein untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Peptide mit Cystein in einer bestimmten Position bevorzugt in thioester-basierten Kondensationen reagierten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Chemoselektive Peptidfragmentverknüpfungsverfahren	3
2.1	Verknüpfung geschützter Peptidfragmente	3
2.2	Kondensation ungeschützter Fragmente	3
2.3	Grundlegende Beobachtungen und Experimente	4
2.4	Templatkatalysierte Peptidligation	5
2.5	Native Chemische Ligation	5
2.6	Thioestersynthese-Strategien	8
2.7	Alternative Strategien für Cysteinverknüpfungsstellen	9
2.8	Ligation mit Aminosäuren außer Cystein	11
2.9	Cystein-freie auxiliar-basierte Ligation	13
2.10	Ligations-Entschwefelungs-Strategie	16
2.11	Ligation über seitenketten-verknüpfte Gruppen	18
2.12	Die „spurlose“ Staudinger Ligation	19
3	Zielsetzung	21
4	Diskussion und Ergebnisse	25
4.1	Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare	25
4.1.1	Konzept	25
4.1.2	Synthese eines Nitroauxiliarsynthesebausteines	26
4.1.3	Synthese eines Nitrilauxiliarbausteines	35
4.1.4	Synthese eines Modellpeptides	41
4.1.5	Cystein-freie Peptidfragmentverknüpfung	51
4.1.6	Abspaltung des Auxiliars	53
4.1.7	Zusammenfassung	57
4.2	Native chemische Verknüpfung mit Valin	59
4.2.1	Einleitung und Konzept	59
4.2.2	Penicillaminligation mit Glycinthioestern	60
4.2.3	Ligation mit höherem und hohem sterischen Anspruch	64
4.2.4	Metall-basierte Entschwefelung	67
4.2.5	Metall-freie Entschwefelung	67
4.2.6	Zusammenfassung	69
4.3	Ligation mit internem Cystein	72
4.3.1	Einleitung und Konzept	72

4.3.2	Glycin und Alanin als <i>N</i> -terminales Nucleophil	74
4.3.3	Ligationen mit erhöhtem sterischen Anspruch	77
4.3.4	Weiterführende Experimente	80
4.3.5	Zusammenfassung	81
5	Zusammenfassung und Ausblick	83
5.1	Zusammenfassung	83
5.2	Ausblick	89
6	Experimenteller Teil	91
6.1	Messgeräte und Hilfsmittel	91
6.1.1	Chemikalien	91
6.1.2	Dünnschichtchromatographie	91
6.1.3	Kernresonanzspektroskopie	91
6.1.4	Hochaufgelöste Massenspektrometrie	92
6.1.5	Flash-Säulenchromatographie	92
6.1.6	Semi-präparative und präparative HPLC	92
6.1.7	Analytische HPLC	92
6.1.8	Analytische HPLC-MS	93
6.1.9	Analytische UPLC-MS	93
6.1.10	MALDI/TOF-Massenspektrometrie	94
6.1.11	UV-Spektroskopie	94
6.2	Allgemeine Arbeits- und Synthesevorschriften	94
6.2.1	Harzbeladung	94
6.2.2	Manuelle Peptidfestphasensynthese	95
6.2.3	Automatisierte Festphasenpeptidsynthese	97
6.2.4	Puffer	98
6.2.5	Native chemische Verknüpfung	98
6.2.6	Entschwefelung	100
6.3	Versuche zu Kapitel 4.1	101
6.3.1	Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines	101
6.3.2	Vorschriften zur Synthese von Nitrilauxiliarglycin	110
6.3.3	Synthese der Peptide	117
6.3.4	Auxiliar-vermittelte Ligation	121
6.3.5	Abspaltung des Auxiliars	122
6.4	Synthese von Peptidthioestern	123
6.5	Versuche zu Kapitel 4.2	125
6.5.1	Synthese der Peptide	125
6.5.2	Ligationen	125
6.5.3	Entschwefelung	125
6.6	Versuche zu Kapitel 4.3: Ligation mit internem Cystein	135
6.6.1	Synthese der Peptide	135
6.6.2	Ligationen	135

Literaturverzeichnis	159
Spektrenanhang	175
1 Kernresonanzspektren	175
2 Chromatogramme und MS Spektren	196
2.1 Peptidthioester	196
2.2 Peptide aus Kapitel 4.1	198
2.3 Peptide aus Kapitel 4.2	200
2.4 Peptide aus Kapitel 4.3	203
Abkürzungsverzeichnis	211

1 Einleitung

Die große Zahl der Genomprojekte hat eine schier unüberschaubare Menge an Sequenzinformationen ans Licht gebracht.[45, 46, 37] Mit Hilfe computer-gestützter Methoden können in dem entschlüsselten Erbgut leicht so genannte offenen Leserahmen identifiziert werden. Struktur und Funktion der dahinter verborgenen Genprodukte können jedoch nicht vorhergesagt werden. Einer der Gründe hierfür ist, dass während der Transkription und der späteren Translation teilweise unerforschte Prozesse Veränderungen der ursprünglichen Information herbeiführen. Die Hauptursache ist jedoch, dass aus einer Nucleinsäuresequenz zwar eine Proteinsequenz vorhergesagt werden kann, dass aber weiter gehenden Aussagen über eine räumliche Strukturierung nur mit großen Einschränkungen möglich sind. Auch die Vielzahl von Aufgaben die Proteine innerhalb und außerhalb von Organismen erfüllen, kann anhand von Sequenzdaten nur abgeschätzt werden. Da Proteine lebenswichtige Prozesse steuern bzw. bewerkstelligen, stehen sie im Fokus biomedizinischer Forschung.

Eine Voraussetzung für die Aufklärung des Zusammenspiels von Proteinen ist ein Zugang zu Peptidmaterial mit hoher Reinheit. Prinzipiell stehen zwei verschiedene Ansätze zur Bereitstellung homogene Proteins zur Verfügung: biotechnologische Verfahren und chemische Methoden.

Sind geeignete Expressionssysteme vorhanden, können mit Hilfe biotechnologischer Verfahren Proteine in vergleichsweise großen Mengen zugänglich gemacht werden. Dies ist jedoch nicht immer ohne Probleme möglich. Viele Proteine werden während oder nach ihrer Entstehung modifiziert z. B. durch Glycosylierungen oder Phosphorylierungen. Diese Gruppen üben einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion aus. Biotechnologische Verfahren können diesen Anforderungen nur bedingt nachkommen, da Modifizierungen *in vivo* oftmals nicht oder unvollständig erfolgen. Außerdem bestimmt das Expressionssystem den Grad und/oder die Art der Modifizierung. Auch der Einbau nicht-proteinogener Strukturen, die der Aufklärung bestimmter Prozesse dienlich sein können, ist in Zellkultur nicht möglich.

Mittels chemischer Methoden können Veränderungen an Peptidrückgrat und Seitenketten sowie die Einbeziehung von Proteinmodifikationen schnell und mit relativ geringem Aufwand vorgenommen werden. Das Standardverfahren zur Herstellung von Peptiden ist die Festphasenpeptidsynthese.[100] Diese Methode beruht auf der iterativen Wiederholung von Reaktionsschritten ohne die Notwendigkeit für zwischenzeitliche Reinigungsprozeduren. Von enormen Vorteil ist, dass Reagenzien in hohem Überschuss eingesetzt werden können, wodurch nahezu vollständige Umsätze erreichbar sind. Überschüssiges Synthesematerial und Reaktionsnebenprodukte können durch einfaches Waschen des Trägerpolymers entfernt

werden. Da die einzelnen Reaktionsschritte nur nahezu vollständig verlaufen, tritt vor allem bei der Synthese längerer Peptidsequenzen zwangsläufig die Bildung von Nebenprodukten auf. Mit der Festphasensynthese können Peptide mit einer Länge von etwa 30 Aminosäuren routine-mäßig hergestellt werden. Längere Peptide mit bis zu 100 Aminosäuren bedürfen spezieller Maßnahmen, wie etwa die Verwendung effektiverer Kupplungsreagenzien[30] oder den Einsatz spezieller Synthesebausteine.[36] Bei der Festphasensynthese des zur Zeit als am längsten geltenden Peptides mit 111 Aminosäuren wurde Mikrowellen-Strahlung eingesetzt.[61]

Diese Grenze kann mit Hilfe konvergenter Methoden überschritten werden, die die Verknüpfung ganzer Peptidfragmente ermöglichen. Im einfachsten Fall werden durch Peptidfragmentkupplungen geschützte Segmente miteinander verknüpft. Da jedoch die Löslichkeit blockierter Peptide mit wachsender Größe stark abnimmt, wird die Ligation ungeschützter Fragmente vorgezogen. Deblockierte Peptide verfügen über viele reaktive Aminosäureseitenketten und somit muss die Verknüpfungsreaktion in hohem Maße chemoselektiv sein. Die selektive Reaktion von Gruppen, die natürlicher Weise nicht in Peptiden enthalten sind, führt oftmals zur Bildung nicht-nativer Strukturen.[16, 43] Der Etablierung solcher unnatürlichen Strukturen, die störende Auswirkungen auf Struktur und Funktion haben können, wird die Generierung nativer Peptidbindungen vorgezogen. Die native chemische Ligation ist hierbei das mit Abstand bedeutendste Verfahren.[41, 59, 80] Die Reaktion findet zwischen einem Cysteinpeptid und einem *C*-terminalen Thioester statt. Dabei wird ein Peptidbindung erzeugt, der nicht angesehen werden kann, dass sie mittels chemischer Methoden geknüpft wurden. Die Methode verfügt über ein hohes synthetisches Potential, wird aber durch zwei prinzipielle Einschränkungen begrenzt. Zum einen stellt die Synthese von Peptidthioestern besondere Anforderungen und verläuft nicht so zufriedenstellend wie für Peptidsäuren und Peptidamide gewohnt. Zum anderen kommt nur Cystein als nucleophile Aminosäure in Frage, das in seiner Seltenheit nur durch Tryptophan übertroffen wird.[47] Die Entwicklung von Verfahren wie der erweiterten nativen chemischen Verknüpfung oder der Ligation mit anschließender Entschwefelung ermöglicht die Erschließung von Ligationsstellen ohne Cystein. Diese beiden Strategien sind auch der Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit.

2 Chemoselektive Peptidfragment-verknüpfungsverfahren

2.1 Verknüpfung geschützter Peptidfragmente

Die Kupplung blockierter Peptidfragmente ist eines der einfachsten Verfahren der konvergenten Peptidsynthese.[59, 83, 80, 16, 43, 103] Die Synthese der dafür notwendigen Bausteine gelingt bei Verwendung sehr säure-labiler Linker, wie etwa der 2-Chlortritylgruppe. [9] Nach der Freisetzung vom polymeren Träger kann die α -Aminofunktion des *C*-terminalen Fragmentes mit dem aktivierten *C*-Terminus des zweiten Fragmentes zur Reaktion gebracht werden. Dabei erfolgt die Aktivierung auf Basis von Peptidkupplungsreagenzien wie etwa Carbodiimiden. Nach der erfolgten Fragmentkupplung wird das Peptid der Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen unterworfen. Da aktivierte *N*-acylierte α -Aminosäuren sehr leicht der Bildung von Oxazolonen unterliegen, ist eine racemisierungsfreie Kupplung nur mit *C*-terminalem Glycin oder Prolin möglich.[10, 119]

2.2 Kondensation ungeschützter Peptidfragmente durch direkte Aminolyse

Die Verknüpfung von ungeschützten Peptidfragmenten gelingt durch direkte Aminolyse *C*-terminaler *p*-Nitrophenyl-[78], *N*-Ethylsalicylamid-[76] oder Thioester.[111] Diese vergleichsweise langsam verlaufenden Reaktionen können jedoch von Racemisierung begleitet sein. Die Hydrolyse der Startmaterialien, welche zum Teil in sehr hohen Anfangskonzentrationen vorliegen müssen, kann durch die Verwendung organischer Co-Solvenzien unterdrückt werden. Da auch irreversible Amidknüpfungen mit Lysinen auftreten können, müssen deren ε -Aminofunktionen blockiert sein.[111]

Zur Aktivierung deblockierter Peptidthiosäuren oder -thioester für direkte Aminolysereaktionen können auch Kupfer- oder Silbersalze verwendet werden. [13, 63, 70] Auch hierbei können Lysinseitenketten unerwünschte Nebenreaktionen eingehen, was deren Blockierung unabdingbar macht. Wie auch bei der Verknüpfung

2.3 Grundlegende Beobachtungen und Experimente

geschützter Peptidfragmente (Abschnitt 2.1) empfiehlt sich aufgrund der Racemisierungsgefahr die Verwendung von Glycin oder Prolin als *C*-terminaler Aminosäureinheit.

2.3 Grundlegende Experimente zur Knüpfung von Peptidbindungen

Bereits 1953 wurde durch Wieland *et al.* über besondere Reaktionseigenschaften von Aminosäurethioestern berichtet (Abb. 2.1).[142] So konnte der Cystaminylcynthioester **1** bei dessen Synthese nicht als solcher isoliert werden, da dieser einem $S \rightarrow N$ -Acyltransfer zum Amid **2** unterlag. Auch die bemerkenswerte Reaktion zwischen dem Phenylvalinthioester **3** und Cystein **4** wurde beschrieben, deren Produkt das Valylcysteinidipeptid **6** war. Der dazu postulierte Mechanismus beinhaltete den Austausch des Thiophenols als Thiolkomponente in **3** gegen Cystein. Durch die sich anschließende $S \rightarrow N$ -Acylverschiebung konnte die Amidbindung in **6** ausbildet werden.

Brenner *et al.* beschrieben 1955 die Synthese von Di- und Tripeptiden anhand einer Umlagerungsreaktion, die auf einem $O \rightarrow N$ -Acyltransfer basierte.[22] Hierbei fungierte Salicylsäure als Templat für die Verknüpfung der Aminosäuren. Deren phenolische Hydroxylfunktion wurde hierzu mit dem späteren *N*-terminalen Phenylalanin verestert, wohingegen die in *meta*-Stellung befindliche Carboxylgruppe als Amid des Glycins vorlag. Eine Anhebung des pH-Wertes induzierte eine Reaktion der freien α -Aminofunktion mit dem benachbarten Carboxylkohlenstoffa-

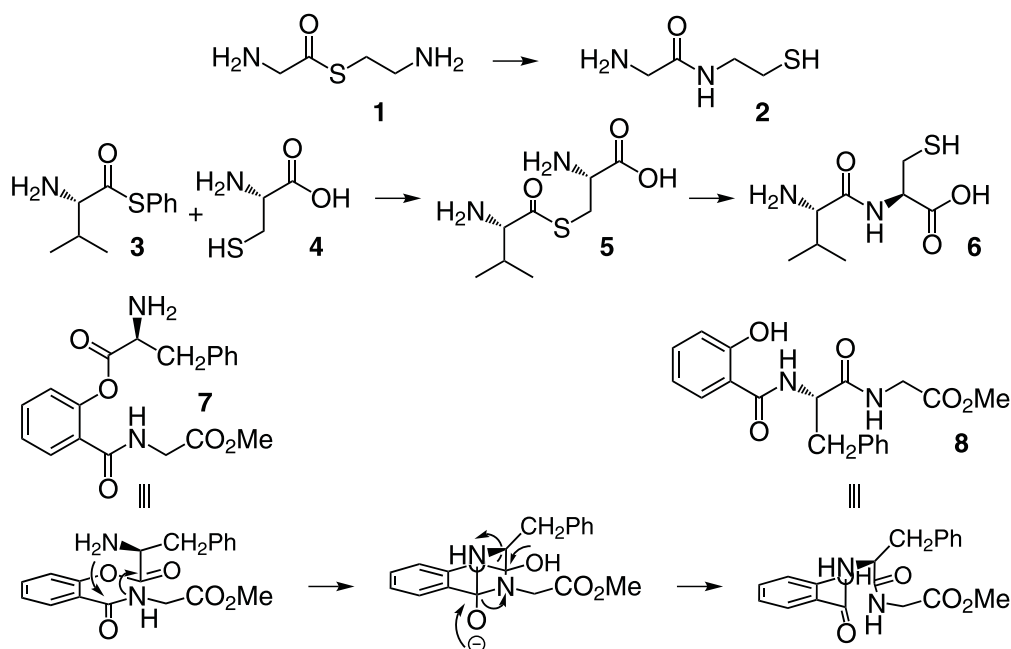


Abbildung 2.1: Grundlegende Experimente

tom der Amidgruppe in **7**. Simultan erfolgte ein Angriff des Amidstickstoffatoms auf die Phenylestergruppierung. In diesem Reaktionsteilschritt, der einem $O \rightarrow N$ -Acytransfer entspricht, wurde die phenolische Hydroxylfunktion der Salicylsäure freigesetzt. Gleichzeitig nahm das Phenylalanin die Position des Glycins unter Bildung des Konjugates **8** am Salicylsäure-Templat ein.

2.4 Templatkatalysierte Peptidligation

Die von Kemp *et al.* entwickelte Prior-Thiol-Capture-Strategie war nach der durch Brenner beschriebenen Acyleinlagerung (vgl. 2.3) das erste Verfahren zur Verknüpfung ungeschützter Peptidfragmente, dass auf einer intramolekularen Verschiebung eines Acylrestes basierte. Das Acylfragment lag hierbei als Ester **9** eines Auxiliartemplates wie dem Dibenzofurangerüst **13** vor (Abb. 2.2).[77] Die freie Mercaptofunktion ermöglichte durch einen Disulfidaustausch die Anbindung des zu verknüpfenden Peptidfragmentes **10**. Der nucleophile Cysteinterminus und die Esterfunktion wurden dadurch in einen für die Aminolysereaktion optimalen Abstand zueinander positioniert. Das Dibenzofurantemplat bewirkte zusätzlich eine Erhöhung der Elektrophilie des Esters **11**, wodurch der $O \rightarrow N$ -Acytransferschritt leichter vonstatten gehen konnte. Eine abschließende reduktive Spaltung der Disulfidbindung in **12** setzte das Zielpeptid **14** frei.

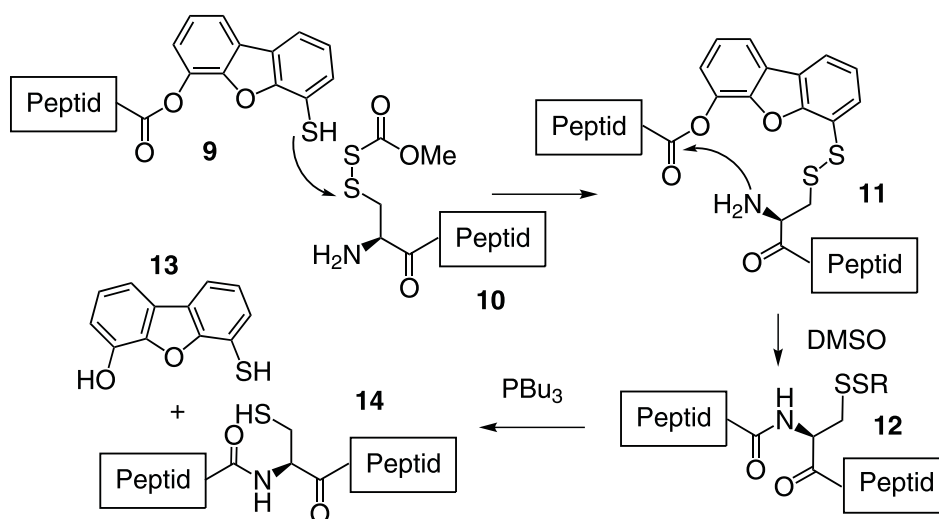


Abbildung 2.2: „Prior-Thiol-Capture“-Strategie nach Kemp *et al.*

2.5 Native Chemische Ligation

Die von Kent *et al.* vorgestellte native chemische Verknüpfung ist das heutzutage in der konvergenten Peptid- und Proteinsynthese am häufigsten verwendete Verfahren (Abb. 2.3). Bei dieser Reaktion, die zwischen ungeschützten Peptidfragmenten

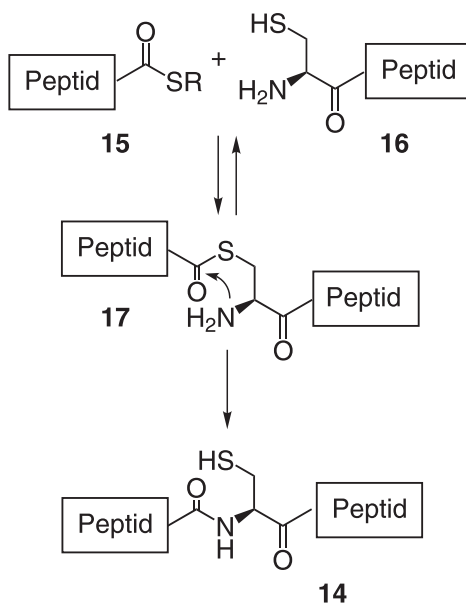


Abbildung 2.3: Mechanismus der nativen chemischen Verknüpfung

stattfinden kann, erfolgt zunächst ein reversibler Austausch der Thiolkomponente des *C*-terminalen Peptidthioesters **15** gegen die Thiolfunktion des *N*-terminalen Cysteinpeptides **16**. Das dabei entstehende Thioesterintermediat **17** unterliegt einem $S \rightarrow N$ -Acylovertrag, durch den eine Amidbindung zwischen den beiden Peptidfragmenten hergestellt wird.[41]

Von großer praktischer Bedeutung sind die milden Bedingungen, die eine Reaktionsführung in wässrigen Pufferlösungen bei neutralem pH ermöglichen. Eine Erhöhung des pH-Wertes bewirkt in erster Linie, dass der eingesetzte Thioester durch eine vermehrt ablaufende Hydrolyse für die Ligation verloren geht. Doch auch die Acylierung von Lysinseitenketten durch direkte Aminolyse und die Racemisierung der *C*-terminalen Thioesteramino­säure sind unerwünschte Nebenreaktionen, die mit einer zu starken Alkalisierung des Reaktionsmediums einhergehen können. Die Absenkung des pH-Wertes unter 6,5 erwirkt eine Verminderung dieser Konkurrenzreaktionen, was jedoch mit einer Verlangsamung der Reaktion durch die Verringerung der Nucleophilie des *N*-terminalen Cysteins einhergeht.

Einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat auch die *C*-terminale Aminosäure des Thioesterpeptides. Eine umfassende Untersuchung hierzu wurde von Dawson und Hackeng durchgeführt.[60] Die höchsten Reaktionsraten konnten bei Gly- oder His-Thioestern beobachtet werden (Tab. 2.1). Ligationen an β -verzweigte Aminosäuren wie Isoleucin oder Threonin verliefen hingegen nur sehr langsam. Asp- und Glu-Thioestern können durch den Angriff der Aminosäureseitenkette der Cyclisierung zu Bernsteinsäure- bzw. Glutarsäureanhydriden unterliegen. Diese Intermediate waren zwar zur Fragmentkupplung befähigt, doch ging mit deren Auftreten auch die Bildung von β - bzw. γ -Peptiden sowie Racemisierung einher.[138] Auch von Lysinthioestern sind Cyclisierungsreaktionen be-

Tabelle 2.1: Einfluss der *C*-terminalen Aminosäure auf die Thioesterreaktivität[60]

Reaktivität			
sehr hoch	hoch	moderat	niedrig
Gly,	Phe,	Asn, Asp,	Leu,
His,	Met, Tyr,	Gln, Glu,	Thr, Val,
Cys	Ala,	Ser, Arg,	Ile
	Trp	Lys	Pro

kannt, bei denen aber zumindest nur unreaktive Lactamringe als Nebenprodukte gebildet wurden, die den eigentlichen Reaktionsverlauf nicht störten.[84]

Die Oxidation des nucleophilen Cysteinpeptides zieht ebenfalls eine Verminderung der Reaktionsrate nach sich. Diese Disulfidbildung kann aber durch Zugabe von reduzierenden Phosphanreagenzien unterbunden werden. Auch die oftmals eingesetzten Thioladditive können durch eine Thiolaustauschreaktion Cysteinpeptide reduzieren.

Der primäre Grund für die Verwendung von Thioladditiven ist jedoch deren reaktionsbeschleunigende Wirkung. Durch Zugabe im Überschuss können die eingesetzten Peptidthioester in reaktivere Spezies überführt werden, die dann im Thiol-Thioester-Gleichgewicht erheblich schneller mit den Cysteinpeptiden reagieren. Die vergleichsweise geringe Reaktivität von Alkylthioestern ist für deren Synthese von Vorteil, vermindert jedoch deren Ligationspotential. Durch Zusatz aromatischer Thiole wie Thiophenol oder 4-(Carboxymethyl)thiophenol zum Ligationsgemisch können diese *in situ* in reaktivere Arylthioester überführt werden.[40, 72] Die unterschiedlichen Reaktivitäten von Alkyl- und Arylthioestern konnten von Kent *et al.* für die kinetisch kontrollierte, konsekutive Ligation mehrerer Peptidfragmente ausgenutzt werden.[7]

Ein weiterer die Ligationsrate beeinflussender Faktor ist die Konzentration der zu verknüpfenden Peptidfragmente und die Zugänglichkeit zu den reaktiven Gruppen. Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen kann zum einen die Löslichkeit der Peptide vermindert und zum anderen das *N*-terminale Cystein oder der *C*-terminale Thioester effektiv abgeschirmt sein. Der Zusatz chaotroper Substanzen wie Harnstoff oder Guanidin behindert die Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb der Peptidkette und stellt deren Löslichkeit wieder her. Das denaturierende SDS ermöglichte die Ligation unpolarer Membranproteinfragmente. [137]

2.6 Thioestersynthese-Strategien

Der begrenzte synthetische Zugang zu Peptidthioestern stellt eine der Hauptlimitationen für die Anwendung und Entwicklung der nativen chemischen Ligation dar. Anders als von Peptidsäuren und -amiden gewohnt, können Thioester nicht mittels der Fmoc/*t*Bu-Strategie hergestellt werden, da sie dem nucleophilen Angriff des hier verwendeten Piperidins unterliegen.

Der Basenlabilität der Thioesterstruktur Rechnung tragend erfolgt die Synthese von Peptidthioestern zumeist unter Anwendung der Boc/Bzl-Festphasensynthesestrategie. [64] Die Ablösung vom Trägerpolymer erfordert jedoch den Einsatz starker Säuren, die nicht mit Peptidmodifikationen wie Glycosylierungen oder Phosphorylierungen vereinbar sind. Zudem ist die Automatisierbarkeit der Boc/Bzl-Strategie durch die obligatorische Verwendung der korrosiven Trifluoressigsäure begrenzt.

Wesentliche Anstrengungen gelten daher der Entwicklung von Methoden, welche die Anwendung der milderen Fmoc-basierten Festphasensynthese zulassen. Durch alternative Fmoc-Deblockierungsbedingungen, bei denen weniger nucleophile Gemische von DBU/HOBt [35, 25] oder 1-Methylpyrrolidin/HOBt/Hexamethylenimin [89, 65] verwendet wurden, konnte das Problem der vorzeitigen Thioester-Abspaltung nicht gänzlich ausgeräumt werden.

Vollständig geschützte Peptide konnten durch die Verwendung sehr säureempfindlicher Harze mit der Fmoc/*t*Bu-Strategie hergestellt und danach durch die Aktivierung der freien *C*-terminalen Carbonsäurefunktion in Thioester überführt werden. [51] Diese Vorgehensweise ist jedoch durch die verminderte Löslichkeit größerer geschützter Peptidfragmente limitiert. Der ungewollten Racemisierung des *C*-Terminus konnte durch Anwendung geeigneter Aktivierungsbedingungen entgegnet werden. [48, 102] Beschrieben wurde auch eine Lewis-Säure-induzierte Thiolyse des Trägerharzes, wobei aber die Bildung von Nebenprodukten zu verzeichnen war. [127, 122]

Auch die Möglichkeit alternativer Fixierungen des Peptides am polymeren Träger über Rückgratamidfunktionen oder eine geeignete Aminosäureseitenketten wurde genutzt. [1, 2, 136, 50, 88] Die Thioesterstruktur wurde hierbei erst im Anschluss an die Sequenzassemblierung nach der Entfernung einer orthogonalen Schutzgruppe vom *C*-Terminus des Peptides etabliert. Bei Verwendung einer Tri-thioorthoestermaskierung konnte die Thioesterfunktion von Anbeginn der Festphasensynthese mitgeführt werden. [21]

Neuere, konzeptionell interessante Strategien beruhten auf $N \rightarrow S$ -Acyltransfers [75, 109, 67, 106, 66, 101, 133], die jedoch teilweise spezieller Synthesebausteine bedürfen. Bei der alternativen Nutzung eines $O \rightarrow S$ -Acyltransfers konnten höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden, allerdings unterlag die hierbei zum Tragen kommende Esterverankerung während der Festphasensynthese einer verstärkten Hydrolyse. [19] Diese ausbeute-mindernde Nebenreaktion war bei der Lösungssynthese von *o*-Thiophenylestern ausgeschlossen. [44]

Auch durch die Verwendung eines Arylhydrazinlinkers konnte eine Fmoc-basierte Peptidthioestersynthese durchgeführt werden. Die Abspaltung des Peptides mit einem Aminosäurethioester wurde durch die Behandlung mit *N*-Bromsuccinimid eingeleitet.[27] Diese oxidativen Bedingungen waren jedoch nicht mit tryptophan- oder methionin-haltigen Peptiden vereinbar.

Den wohl am häufigsten genutzten, Fmoc-basierten Zugang zu Peptidthioestern eröffnete der basen- und säurestabile Kenner Sulfonamid „Safety Catch Linker“. [79, 5] Durch die chemoselektive Alkylierung mit Iodacetonitril oder Trimethylsilyldiazomethan konnte die *N*-Acylsulfonamid-Bindung für eine nucleophile Spaltung aktiviert werden. Danach wurden die Peptide als blockierte Thioester durch Thiolyse vom Syntheseharz abgelöst.[4, 69, 124]

Den vorstehend beschriebenen Methoden ist zu eigen, dass die Reinigung der Rohprodukte durch das mögliche Auftreten von Abbruchsequenzen erschwert ist. Deren Thioesterstrukturen können zudem Nebenreaktionen wie Hydrolyse unterliegen, wodurch die Reinigung des Produktes nochmals verkompliziert wird. Bei der Methode mit Selbstreinigungseffekt nach Mende *et al.* fielen hingegen lediglich gewünschte Vollängenprodukte bei der finalen Ablösung vom polymeren Träger an.[98] Hierbei wurde nach Abschluss der Sequenzassemblierung ein spezieller Cyclisierungslinker gekuppelt, mit dem danach auch eine *N*-terminale Fixierung des Peptides am polymeren Träger erfolgte. Da Abbruchsequenzen aufgrund gekappter *N*-Termini von dieser Prozedur ausgeschlossen waren, verblieben bei der anschließenden thiolytischen Spaltung der *C*-terminalen Fixierung nur Produkte mit vollständiger Sequenz am Harz. Durch die abschließende Acidolyse wurde die verbleibende Verknüpfung mit dem Syntheseharz aufgehoben und das Peptid freigesetzt.[98, 99]

In einer dazu konzeptionell verschiedenen „Safety-Catch“-Strategie wurde 3,4-Diaminobenzoesäure als Festphasensyntheseanker verwendet. Nach Abschluss der Sequenzassemblierung, für die eine der 3,4-Diaminobenzoesäureaminogruppe Ausgangspunkt war, wurde die verbleibende Aminofunktion mit *p*-Nitrophenylchlorformiat acyliert. Der dabei gebildete Aktivester unterlag einem intramolekularen Angriff durch die benachbarte *C*-terminale Amidfunktion des Peptides. Die so gebildete Benzimidazoloneinheit konnte nach der Acidolyse thiolysiert werden.[14]

2.7 Andere Strategien für Peptidkupplungen an Cysteinerverknüpfungsstellen

Alternative Strategien zur Verknüpfung von Peptidfragmenten an Cysteinligationsstellen wurden von Tam *et al.* untersucht.[129, 90] Bei der Reaktion der Peptidthiocarbonsäuren **18** mit dem β -Bromalaninpeptid **20** wurde wie bei der nativen chemischen Verknüpfung zunächst auch ein Thioesterintermediat (**17**) gebildet.[129] Hierbei erfolgte aber im Gegensatz zur nativen chemischen Ligation ein reverser, nucleophiler Angriff der Acylkomponente **18** auf das elektrophile *C*-

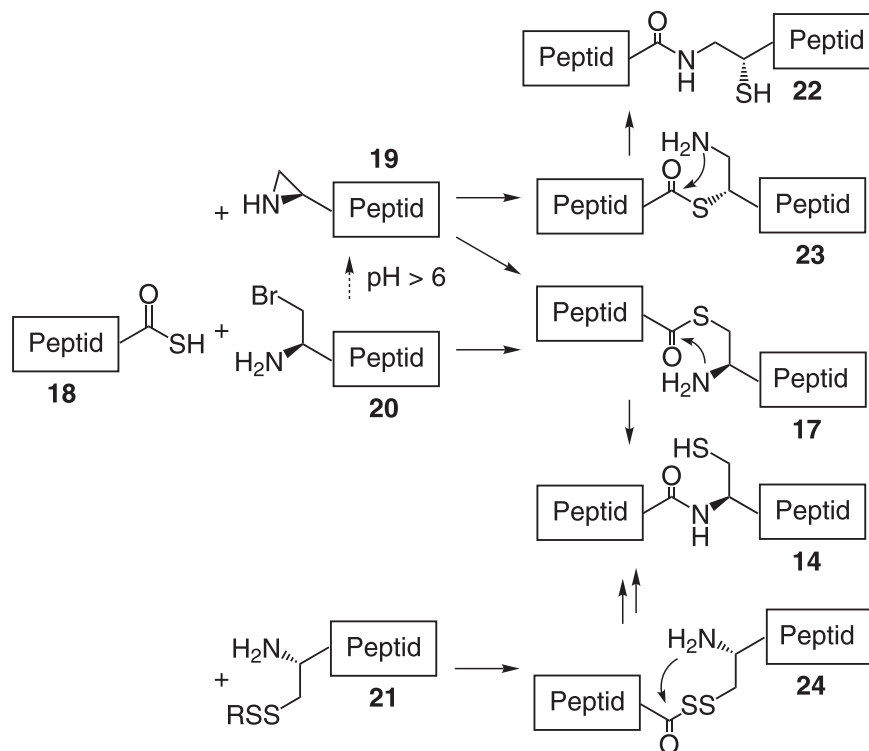


Abbildung 2.4: Bei den alternative Ligationsstrategien reagierte die Acylkomponente in Form der Thiocarbonsäure **18** nicht als Nucleophil sondern als Elektrophil mit dem β -Bromalaninpeptid **20** oder dem Disulfid **21** zum Peptid **14**. Das Bromalaninpeptid **20** unterlag einer Cyclisierung, so dass bei dessen Umsetzung auch das β -Peptid **22** gebildet wurde.

terminale Peptidfragment **20**. Dann wurde bei der Verschiebung des *N*-terminalen Acylrestes die Amidbindung etabliert.

Bei dieser Ligationsreaktion waren leicht saure Reaktionsbedingungen (pH 5) aufgrund der hohen Nucleophilie der Thiocarbonsäure **18** nicht nur möglich sondern auch bevorzugt. Eine Erhöhung des pH-Wertes induzierte durch eine intramolekulare S_N2 -Reaktion die Bildung der unerwünschten elektrophilen Aziridinspezies **19**. Durch einen unselektiven nucleophilen Angriff des Thiocarbonsäurepeptids **18** erfolgte dessen Ringöffnung, die neben dem Cysteinthioesterintermediat **17** auch das Isocysteinthioesterintermediat **23** hervorbrachte. Somit entstand neben dem Cysteinpeptid **14** auch das β -Peptid **22**.

Bei der Umsetzung des Disulfides **21** mit der Peptidthiocarbonsäure **18** reagierte diese ebenfalls als Nucleophil.[90] In einer Disulfidaustauschreaktion wurde dabei der Peptidperthioester **24** gebildet. Nach intramolekularem $S \rightarrow N$ -Acyltransfer und anschließender Reduktion der Cysteinseitenkette konnte das Peptid **14** erhalten werden.

2.8 Ligation mit anderen Aminosäuren und Modifikation von Ligationsprodukten

Die allgemeine Anwendbarkeit der nativen chemischen Verknüpfung wird durch das seltene Auftreten des Cysteins in natürlichen Proteinsequenzen begrenzt. Mit einem Anteil von lediglich 1,4 % [47] tritt es zudem häufig an Positionen auf, die für eine Verknüpfung nicht geeignet sind. Um dieser Einschränkung zu begegnen, wurde bereits kurz nach der ersten Anwendung nach Möglichkeiten gesucht, mit denen das Reaktionsprinzip auch auf andere Aminosäuren angewendet werden konnte.

Eine Verknüpfung von *N*-terminalen Histidinpeptiden gelang mit Perthioestern als Kupplungspartner. Aufgrund der höheren Elektrophilie der Acylkomponente traten aber auch Modifikationen anderer nucleophiler Seitenketten innerhalb des Peptides auf.[146]

Durch die Ligation mit Homocystein und dessen anschließende Methylierung konnten Methioninverknüpfungsstellen erschlossen werden.[130, 110, 121] Die längere Seitenkette des Homocysteins ermöglichte jedoch auch eine Abspaltung dieses Aminosäurerestes durch eine nucleophilen Angriff auf die eigene Carboxylfunktion. [130] Der vergleichsweise unselektiven Methylierung des Homocysteinrestes mit Methyl-*p*-nitrobenzylsulfonat[130] oder Methyljodid[110] unterlagen auch andere nucleophile Aminosäureseitenketten.

Die Fragmentverknüpfung mit Selenocystein verlief wie Ligationen mit Cystein problemlos.[68, 53, 116] Die höhere Nucleophilie der Selenolfunktion verleiht diesem Aminosäurerest eine im Vergleich zum Cystein erhöhte Reaktivität. Die Anwendbarkeit ist jedoch durch das äußerst seltene Auftreten des Selenocysteins als 21. proteinogener Aminosäure stark beschränkt. Zudem ist die Verwendung selen-haltiger Verbindungen aufgrund ihrer Toxizitätseigenschaften nicht unproblematisch.

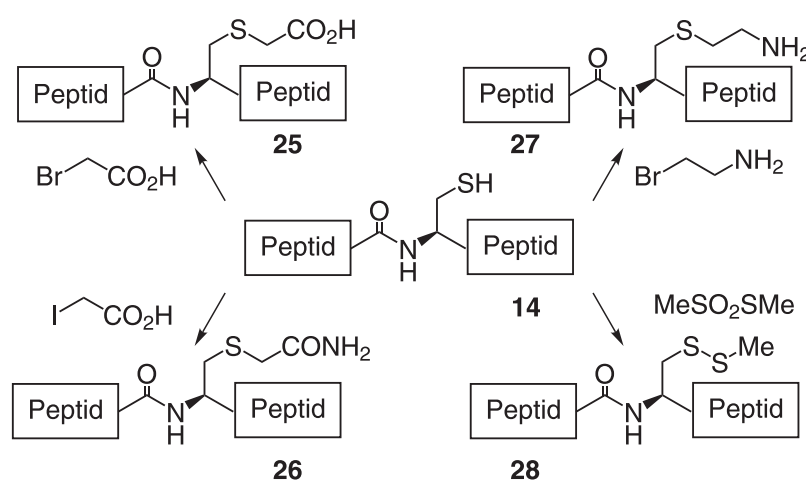


Abbildung 2.5: Alkylierung von Ligationsprodukten.

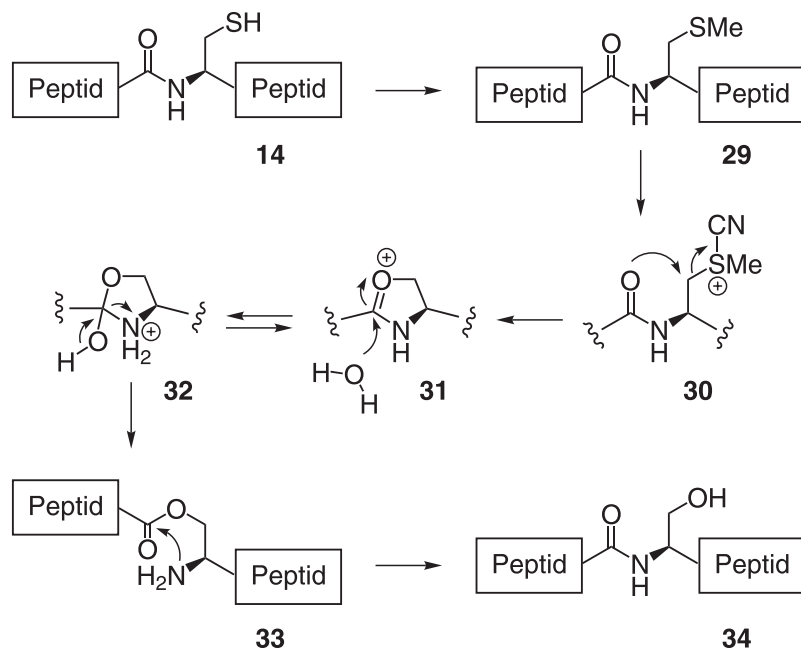


Abbildung 2.6: Umwandlung eines Cysteinligationsproduktes zum Serinligationsprodukt. Nach der Methylierung des Cysteins erfolgte eine Reaktion mit Bromcyan. Dadurch konnte eine Reaktionskaskade initiiert werden, die mit der Bildung des Depsipeptides **33** endete, das durch einen *O*→*N*-Acylshift in das Serinpeptid **34** überführt werden konnte.

Durch die Alkylierung der Thiolseitenkette konnten Cysteine innerhalb von Ligationenprodukten in (Thio-)Analoge anderer proteinogener Aminosäuren umgewandelt werden. Die Überführung in Glutaminsäure-, Glutamin-, Lysin- oder Methioninanaloge (**25**, **26**, **27** bzw. **28** in Abb. 2.5) gelang dabei durch die Reaktion mit Bromessigsäure[82], Iodacetamid[15], Aziridin bzw. Bromethylamin[15] oder Methylmethanthiosulfonat [42].

Die Konvertierung von Cystein in Serin wurde durch eine Reaktionssequenz ermöglicht, in der zunächst die Cysteinsulfanylfunktion methyliert und der dabei gebildete Cysteinmethylthioether **29** einer Reaktion mit Bromcyan unterworfen wurde. Die Sulfoniumstruktur **30** unterlag einer Cyclisierung, in der das Carboxylsauerstoffatoms der *N*-terminal angrenzenden Aminosäure mit dem elektrophilen β-Kohlenstoffatom des vormaligen Cysteins reagierte. Das elektronendefiziente Ringsystem **31** wurde anschließend durch die Anlagerung von Wasser unter Bildung des Depsipeptides **33** geöffnet. Ein abschließende *O*→*N*-Acyltransfer stellte die Peptidbindung in **34** wieder her.[107, 108]

Peptide mit *N*-terminalem phosphoryliertem Serin reagierten mit Peptidthioestern zunächst unter Bildung einer Phosphorsäureanhydridzwischenstufe, innerhalb der die Transferierung des Acylteils möglich war. Eine nachfolgende Behandlung mit alkalischer Phosphatase bewirkt die Entfernung der Phosphatgruppe. Die Methode ist analog auch auf Peptide phosphoryliertem Threonin anwendbar.[132]

2.9 Cystein-freie auxiliar-basierte Ligation

Zur Erschließung weiterer Verknüpfungsstellen bedient sich das auch als „Extended native chemical ligation“ bekannte Verfahren Auxiliaren.[28, 105, 74, 91, 104] Diese Hilfsgruppen verfügen über eine Mercaptofunktion, welche die Aufgabe der Cysteinseitenkette im Thiol-Thioester-Gleichgewicht übernimmt. Durch Anbindung der Auxiliare an den α -Aminotermius des zu verknüpfenden *C*-terminalen Peptidfragmentes **35** wird die darin enthaltene Thiolfunktion in unmittelbarer Nachbarschaft der *N*-terminalen Aminofunktion des Peptides platziert. Diese Anordnung ermöglicht, dass nach dem reversiblen Thiolaustausch die Wanderung des Acylrest im Thioesterintermediat **36** unter Ausbildung einer Peptidbindung stattfinden kann. Idealerweise können Ligationshilfsgruppen danach vom Rückgrat des gebildeten Peptides **37** abgelöst werden.

Das strukturell sehr einfache Ethylthiolauxiliar (Tab. 2.2, **39**) konnte nicht vom Rückgrat des Peptides abgespalten werden, wodurch dessen Potential begrenzt ist.[28, 8] Glycin-Glycin-Verknüpfungen verliefen sehr schnell und lieferten aufgrund eines optimalen fünfgliedrigen Übergangszustandes während des *S*→*N*-Acyltransfers hohe Ausbeuten.

Erst die Insertion eines Sauerstoffatoms zwischen Ethylthiolgruppe und Peptid ermöglichte eine reduktive Entfernung durch Zink. Allerdings ging damit auch eine Vergrößerung des optimalen fünfgliedrigen Übergangszustandes, der während der *S*→*N*-Verschiebung auftritt, einher. Mit dem Oxyethylthiolauxiliar (Tabelle 2.2, **40**) bedurften Glycin-Glycin-Verknüpfungen längerer Reaktionszeiten und die erreichbaren Ausbeuten sanken. [28, 123]

Ein weiterer Auxiliartypus bediente sich eines 1-Mercapto-2-amino-2-phenethylgerüsts (Tab. 2.2, **41**).[17, 95] Nach dem reversiblen Thiolaustausch wurde der Peptidthioester dem Aminnucleophil für einen nucleophilen Angriff präsentiert, der über einen optimalen fünfgliedrigen Übergangszustand verlief. Aufgrund der sterischen Hinderung durch den Phenylring konnten nur anspruchslöse Gly-Gly- und Ala-Gly-Ligationen in guten Ausbeuten durchgeführt werden. Für die Abspaltung des Phenethylthiolauxiliars musste der Phenylring mit Elektronendonoren

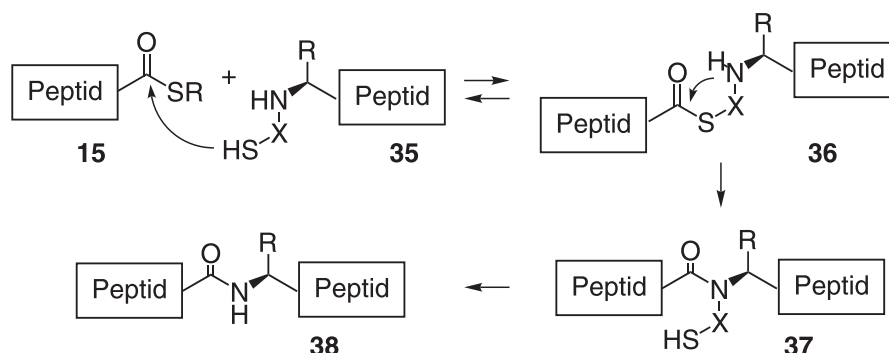
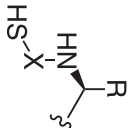
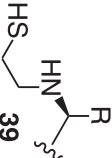
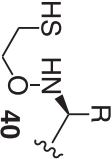
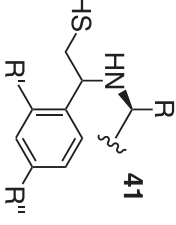
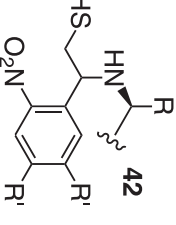
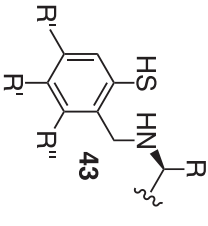


Abbildung 2.7: Cystein-freie Ligation auf der Basis von Auxiliaren

Tabelle 2.2: Auxiliarsysteme

	Ethylthiol- auxiliar	Oxyethyl- thiolauxiliar	Phenethyl- thiolauxiliar	Nitrophenethyl- thiolauxiliar	Mercaptobenzyl- aminauxiliar
					
					
Verknüpfungs- stellen	Gly-Gly	Gly-Gly Ala-Gly Phe-Gly Gly-Ala	Gly-Gly Ala-Gly His-Gly Lys-Gly	Gly-Gly Ala-Gly	Gly-Gly Ala-Gly Phe-Gly Gly-Ala Gly-Gln
Bedingungen für Abspaltung	–	Zn/HOAc	R' = R'' = H: – R' = H; R'' = OMe: HF oder TMSBr R' = R'' = OMe: TFA	R' = H, OMe: λ = 310 – 365	R' = R'' = H: – R' = OMe; R'' = H: HF oder TFMSA R' = R'' = OMe: TFA

substituiert sein, die den Raumanspruch der Gruppe weiter erhöhten. Die vergleichsweise milde Abspaltung mit TFA konnte nur bei Vorhandensein zweier Methoxysubstituenten realisiert werden. Das Phenethylthiolauxiliar ermöglichte die Synthese cyclischer Peptide[29, 131] und die Herstellung von Glycopeptiden.[94] Daneben gelang durch seine Verwendung auch die eindrucksvolle Synthese des 106 Aminosäuren zählenden Cytochrom b₅₆₂. [91]

Die Einführung eines Nitrosubstituenten verlieh dem Phenethylauxiliar photolabile Eigenschaften (Tab. 2.2, **42**). [73, 96] Die Möglichkeit zur Abspaltung des Auxiliars durch UV-Lichtbestrahlung ließ das Auxiliar für speziellere Fragestellungen interessant werden, da die Spaltung z.B. auch intracellulär durchgeführt werden konnte. So konnten ein verstärkt grün-fluoreszierendes Protein durch Verknüpfung mit einem Lipid an einer Membran verankert werden. Durch Bestrahlung der verknüpfenden Nitrophenylauxiliargruppe wurde diese Assoziation wieder aufgehoben.[113] Durch eine mit dem Nitrophenethylauxiliar durchgeführte artifizielle Ubiquitinierung eines H2B-Histonproteins, konnte dessen Einfluss auf die intranucleosomale Methylierung nachgewiesen werden.[33, 97]

Im Mercaptobenzylaminauxiliar befanden sich die Thiofunktion und das benzylische verknüpfte Peptid in α -Stellung zueinander (Tab. 2.2, **43**). [105, 74, 104] Beim Transfer des Acylrestes zum α -Aminostickstoff verhielt sich der aromatische Ring des Auxiliars wie ein Templat und positionierte die beiden reagierenden Gruppen in einem optimalen Abstand. Beim Transfer des Acylrestes kam

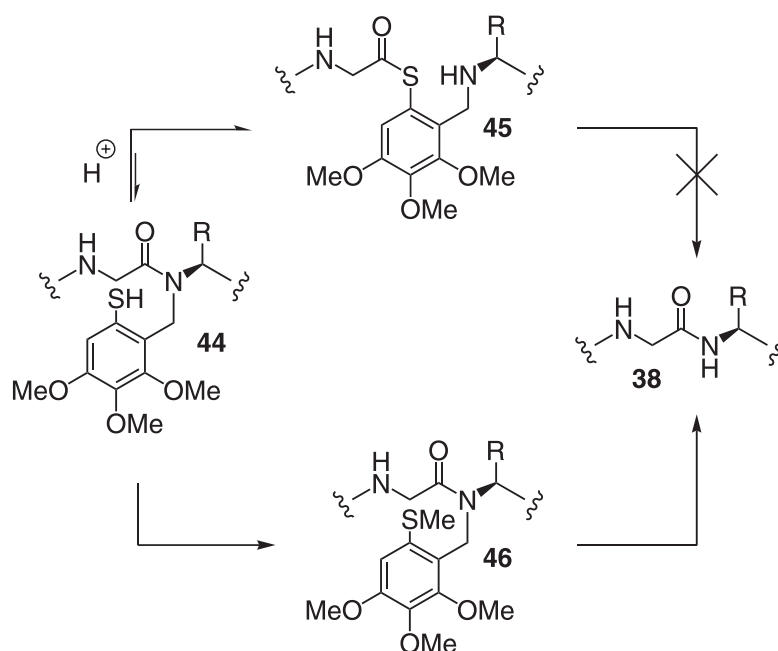


Abbildung 2.8: Die Abspaltung des Mercaptobenzylauxiliars von sterisch anspruchsvollen Ligationsstellen erforderte die vorherige Methylierung deren Sulfanylfunktion, um einer Rückmigration der Acylkomponente zu **45** vorzubeugen.

jedoch der sterische Anspruch des Auxiliars zum Tragen und lediglich Glycin-Glycin-Verknüpfung konnten ohne Probleme hergestellt werden. Andere Peptidverknüpfungen bedurften längerer Reaktionszeiten bzw. Modifikationen der Reaktionsbedingungen zur Erreichung eines vollständigen Umsatzes. So gelang die Ligation eines Glutaminylpeptides mit einem Glycinthioester, wobei jedoch nicht Wasser sondern DMF als Lösungsmittel verwendet wurde.[143] Die ungewollte $N \rightarrow S$ -Rückmigration des Acylrestes von **44** zu **45** während der Ablösung des Auxiliars konnte durch eine Alkylierung dessen Thiolfunktion unterbunden werden (Abb. 2.8) Dieser zusätzliche Reaktionsschritt macht jedoch eventuell die Blockierung unbeteiligter, nucleophiler Peptidseitenketten notwendig. Die Abspaltung des dimethoxysubstituierten Auxiliars erforderte den Einsatz sehr starker Säuren, wohingegen eine vergleichsweise milde Acidolyse mit TFA nur im Falle des trimethoxy-substituierten Derivates gelang. Auxiliare des Mercaptobenzylamin-typs ermöglichten die Synthese komplexer Glycopeptide[143] und die Fragmentverknüpfung der 62 Aminosäuren zählenden α -Spectrin-SH3-Domäne.[104]

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung eines Auxiliars, dessen Ablösung unter milden basischen Bedingungen möglich ist. Zudem sollte das System weniger Raum beanspruchen und dadurch auch die Erschließung von Ligationsstellen mit höherem sterischen Anspruch zulassen (Abschnitt 4.1).

2.10 Ligations-Entschwefelungs-Strategie

Die Ligations-Entschwefelungs-Strategie bietet neben der auxiliar-vermittelten Ligation weitere Möglichkeiten, Peptidfragmente miteinander zu verknüpfen, deren Sequenz kein geeignetes Cystein enthält. Anstelle der wenig reaktiven sekundären Amine, die in der auxiliar-vermittelten Ligation eingesetzt werden, erfolgt hierbei der Einsatz von Sulfanylaminosäuren.[144, 114, 141, 18, 38, 56, 34] Nach der Ligation muss das überschüssige Schwefelatom entfernt werden.

Die Durchführung konventioneller nativer chemischer Verknüpfungen mit Cystein eröffnete auf diesem Wege den Zugang zu Alanin-Ligationsprodukten. [144, 114, 141] Die Erschließung von Phe-Verknüpfungsstellen wurde durch die Verwendung des entsprechenden β -Mercaptoderivates ermöglicht, das jedoch zunächst durch eine mehrstufige Synthese bereitgestellt werden musste.[18, 38] Im Rahmen der Dissertation wurden auf Basis dieser Strategie Ligationen an Valin-Verknüpfungsstellen durchgeführt. Dazu wurde das kommerziell verfügbare Penicillamin als entsprechendes Valinmercaptoderivat herangezogen (Abschnitt 4.2). [56] Danishefsky *et al.* verwendeten zur Verknüpfung von Valinpeptiden ein γ -Mercaptovalinderivat, welches jedoch zuvor synthetisiert werden musste.[34]

Für den nach der Ligation erfolgenden Entschwefelungsprozess kamen zunächst große Überschüsse von Metall-Reagentien zum Einsatz.[144] Der dabei auftretenden, ungewollten Desulfurierung unbeteiligter Cysteine konnte durch die Blockierung der Sulfanylfunktion mit der Acetamidomethyl-Schutzgruppe (Acm) begegnet werden.[114] Die Anwendung dieser Bedingungen brachte jedoch auch uner-

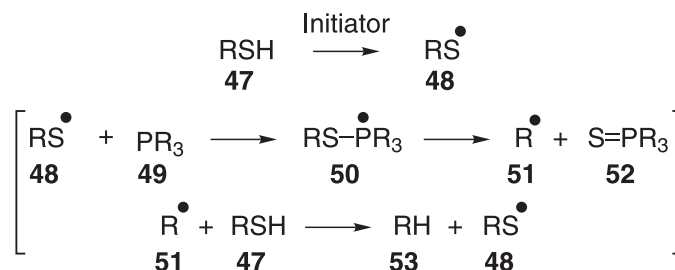


Abbildung 2.9: Mechanismus der metall-freien Entschwefelung

wünschte Nebenreaktionen mit sich. So traten etwa bei Notwendigkeit längerer Reaktionszeiten die unerwünschte Umwandlung von Methionin- in Aminobuttersäurereste oder die Hydrierung von Tryptophan in Erscheinung.[144] Zudem hielt die Thiazolidin-Schutzgruppe, die bei konsekutiven Segmentkupplungen zur intermediären Maskierung *N*-terminaler Cysteine verwendet wird, den metall-basierten Entschwefelungsbedingungen nicht stand.[141] Ein bei der Synthese größerer Peptide auftretendes Problem betrifft die geringen Wiederfindungsraten des Peptidmaterials. Eine quantitative Extraktion ist aufgrund von Adsorption an der großen Metalloberfläche des in hohen Überschüssen eingesetzten Entschwefelungsreagenzes schwierig sicherzustellen.[144]

Die Nachteile der metall-basierten Entschwefelung wurden durch die Entwicklung hochselektiver, metall-freier Bedingungen ausgeräumt.[141] Bereits seit 1956 war eine lichtinduzierte Entschwefelung von Mercaptanen mit Trialkylphosphiten bekannt.[62] Phosphane und *di-tert*-Butylperoxid eigneten sich gleichermaßen als Reduktionsmittel bzw. Radikalstarter, wobei der in Abbildung 2.9 gezeigte Reaktionsmechanismus angenommen wurde.[140, 139] Durch die Reaktion eines unter Lichteinfluss oder durch einen Radikalstarter erzeugten Thiylradikal **48** mit einem Phosphan **49** erfolgte die Bildung einer Phosphoranylspezies **50**. Deren Zerfall lieferte das Alkylradikal **51**, das durch die homolytische Abstraktion eines Wasserstoffatoms von verbleibenden Mercaptanen gesättigt wurde. Die gleichzeitige Bildung einer neuen Thiylspezies **48** sicherte den Fortgang der Radikalkette. So gelang es, mit Triethylboran als Radikalstarter und stark elektrophilen Triethylphosphit als Reduktionsmittel Cystein bzw. Cysteinderivate[54, 39] in Lösung oder auch an fester Phase[3] zu entschwefeln.

Die beiden wasserlöslichen Reagenzien Tricarboxylethylenphosphan und 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) dienten als Basis für die Anwendbarkeit in der Peptidchemie. EtSH und *t*BuSH wurden als Wasserstoffdonoren für die Beschleunigung der bei 37 °C stattfindenden Reaktionskette zugesetzt. Diese Bedingungen waren für freie Sulfanylfunktionen spezifisch und ließen zahlreiche andere schwefelhaltige funktionelle Gruppen (außer Disulfide) unangetastet. Dies ermöglichte unter anderem die chemoselektive Überführung cystein-haltiger Peptide in die entsprechenden alanin-haltigen Peptide, die als weitere schwefel-haltige Bestandteile auch Methionine, Thioester, Biotinderivate oder auch acetamidomethyl- und thiazolidin-blockierte Cysteine enthielten.[141]

Die Überführung der im Rahmen der Dissertation hergestellten Penicillamin- in Valinverknüpfungsprodukte erfolgte nach einer Optimierung auch mittels metallfreier Entschwefelungsbedingungen (Abschnitt 4.2).[56]

2.11 Zucker-vermittelte Ligation und Ligation mit Seitenkettenauxiliar

Die Verwendung von Glycosylaminosäurebausteinen mit thiol-modifiziertem Kohlenhydratteil ermöglichte eine Verschiebung der für das Thiol-Thioester-Gleichgewicht benötigten Sulfanylfunktion in Richtung des *C*-Terminus (Abb. 2.10 **A**). Der Acylrest, dessen erfolgreiche Übertragung die Ausbildung eines macrocyclischen Übergangszustandes voraussetzte, wurde dabei zur primären *N*-terminalen Aminofunktion des Peptides **55** verschoben.[24, 49, 23, 145, 112, 12]

O-glycosidisch mit Serin- oder Threonin- bzw. *N*-glycosidisch mit Asparagin verknüpfte *N*-Acetylglucosaminbausteine wurde hierfür an der 2-Position (Abb. 2.10 **B**) oder 3-Position (Abb. 2.10 **C**) mit einer 2-Mercaptoessigsäureeinheit erweitert.[24, 49] Derart modifizierte Glycopeptide konnten dadurch Ligationsreaktionen unterworfen werden, in denen der glycosylierte Baustein bis zu sieben Aminosäuren in Richtung des *C*-Terminus versetzt war.[112]

Die hohe Variabilität des *N*-terminal angrenzenden Sequenzabschnittes ermöglichte die Knüpfung zahlreicher Ligationsstellen, wobei die Methode insbesondere für die Synthese von Glycopeptiden von Interesse ist.[23] Die Entfernung des überschüssigen Schwefelatoms aus der 2-Position des *N*-Acetylglucosaminrestes (Abb. 2.10 **B**) wurde mittels metall-basierter Methoden durchgeführt.[23, 145] Aufgrund sehr hoher Glycosidase-Sequenzspezifitäten war die Synthese einfacher Peptide nur mit Einschränkungen möglich, da enzymatische Deglycosylierungen nicht vollständig erfolgten.[23]

Die Spaltung des 2-Mercaptoessigsäurerestes aus der 3-OH-Position des *N*-Acetylglucosaminbausteines (Abb. 2.10 **C**) gelang hingegen durch eine einfache Hydrolyse.[49] Auch Glycopeptide mit komplexeren, thiol-modifizierten Kohlenhydratstrukturen konnten in der zucker-vermittelten Ligation eingesetzt werden.[12]

Auf dem Prinzip der zucker-vermittelten Ligation baute auch die Ligation mit Seitenkettenauxiliar auf. Der für den reversiblen Thiolaustausch wichtige Thiolessigsäurerest war hierbei nicht über einen Kohlenhydratbaustein sondern über ein einfacheres Cyclohexangerüst an der Seitenkette von Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Serin mit dem Peptid verbunden (Abb. 2.10 **D**).[92] Nach dem *S*→*N*-Acyltransfer konnte die Esterbindung zur Aminosäureseitenkette durch eine Anhebung des pH-Wertes verseift werden. Das Seitenkettenauxiliar wurde erfolgreich in der Synthese von Proteinen eingesetzt. Allerdings scheiterte dessen Entfernung, da die Esterbindung durch die Faltung des Proteines für die Hydrolyse wahrscheinlich nicht mehr zugänglich war.[86]

Die *S*→*N*-Acyltransferschritte der zucker-vermittelten Ligation und der Liga-

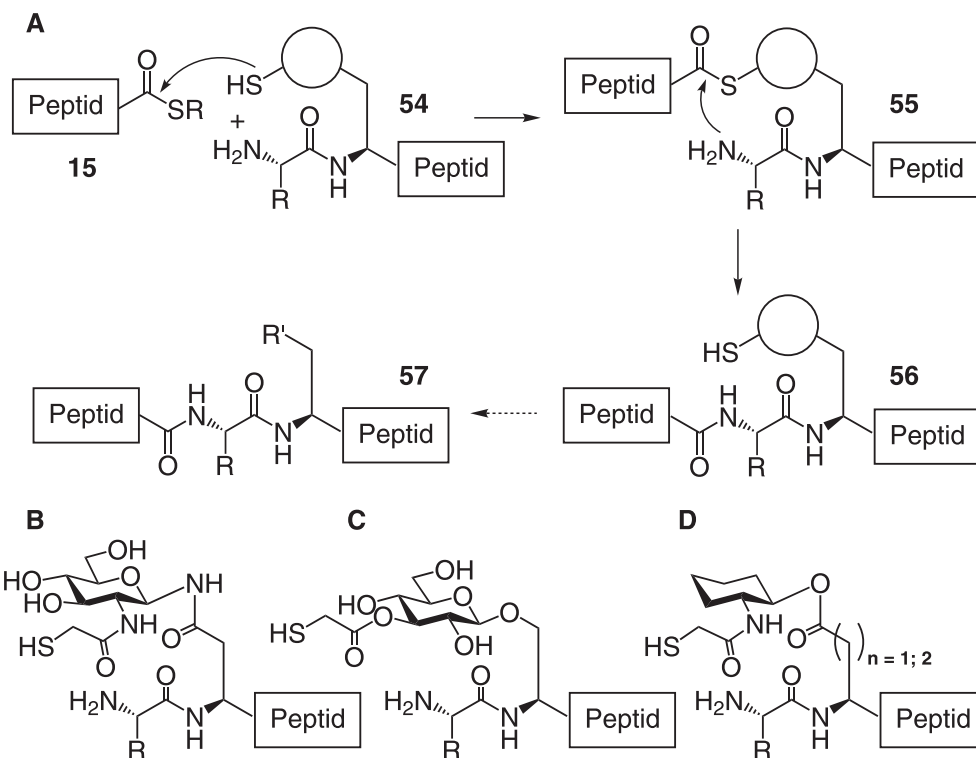


Abbildung 2.10: Prinzip der Ligation mit seitenketten-verknüpften Auxiliaren (A) und Gerüststrukturen (C-D)

tion mit Seitenkettenauxiliar bedürfen beide der Bildung macrocyclischer Übergangszustände. Auch für den Transfer eines Peptidylacylrestes von der Seitenkette eines innerhalb einer Peptidsequenz befindlichen Cysteins zum *N*-Terminus muss eine Konformation eingenommen werden, die eine Macrocyclisierung ermöglicht. Im Rahmen der Dissertation wurden Sequenzen mit internem Cystein auf ihre Fähigkeit hin untersucht diese Voraussetzung zu erfüllen (Abschnitt 4.3).[58]

2.12 Die „spurlose“ Staudinger Ligation

Die „spurlose“ Staudinger Ligation basiert auf der Reaktion eines Phosphanylthioester **58** mit einem *N*-terminalen Peptidazid **59**. Zunächst erfolgte hierbei der Angriff des Azides auf die Phosphaneinheit von **58**, wobei unter Abspaltung von Stickstoff das Aza-Ylid **60** gebildet wurde. Dieses Intermediat ging in einem *S*→*N*-Acyltransfer in **61** über, dessen Hydrolyse das Peptid **37** lieferte.

Die „spurlose“ Staudinger Ligation ist in der Theorie nicht auf bestimmte Aminosäuren beschränkt, wie in der nativen chemischen Ligation der Fall. Aufgrund sterischer Faktoren konnten jedoch nur Gly-Gly- und Gly-Ala- und nach Optimierung der Phosphanylkomponente auch Ala-Ala-Verknüpfungsstellen erschlossen werden.[126] Der geringen Wasserlöslichkeit der Thioester konnte durch Einfüh-

2.12 Die „spurlose“ Staudinger Ligation

Die Reaktion von Dimethylaminosubstituenten am Phosphanylteil entgegen getreten wurden, wodurch jedoch ein rapides Absinken der Ligationserausbeute in Kauf genommen werden musste.[128] Die Cyclisierung kurzer Azido-Peptid-Phosphanylthioester gelang hingegen nach deren vollständiger Deblockierung in DMF mit hohen Ausbeuten.[81]

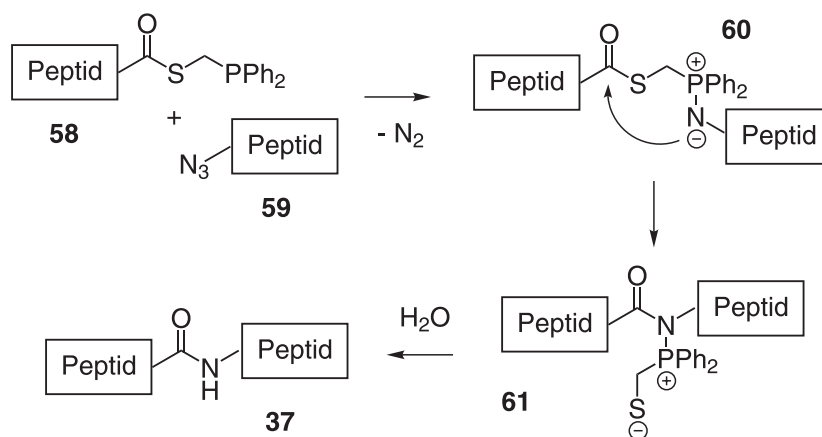


Abbildung 2.11: Mechanismus der „spurlosen“ Staudinger Ligation

3 Zielsetzung

Die cystein-basierte native chemische Ligation ist das bedeutendste Verfahren in der konvergente Synthese von Peptiden und Proteinen.[41] Allerdings stellt das äußerst seltene Auftreten des Cysteins in Proteinsequenzen eine erhebliche Einschränkung dar.[47] Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Vergrößerung des Repertoires an Methoden zur cystein-unabhängigen Peptidfragmentkondensation.

Dazu war geplant, an das Konzept der so genannten erweiterten nativen chemischen Ligation anzuknüpfen. Diese Methode basiert auf der Verwendung *N*-terminal verknüpfter, spaltbarer Auxiliare, deren bisher leistungsfähigste Vertreter von Kent *et al.* (Abb. 3.1 **A**)[17] und Dawson *et al.* (Abb. 3.1 **B**) [105] beschrieben worden sind. Die Auxiliargruppen verfügen über eine Thiofunktion

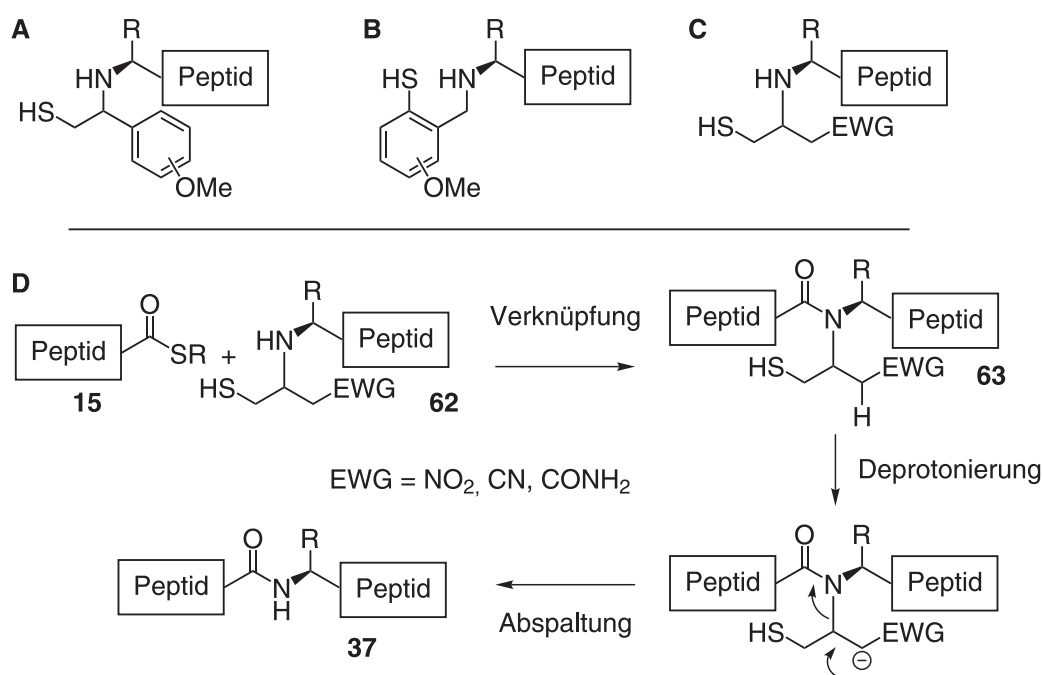


Abbildung 3.1: A: Phenethylauxiliar nach Kent *et al.* [17]; B: Mercaptobenzylauxiliar nach Dawson *et al.* [104]; C: Struktur eines basen-labilen Auxiliars; D: Konzept der erweiterten Ligation mit Hilfe basen-labiler Auxiliare. Nach der Verknüpfung der Peptidfragmente **15** und **62** könnte in α -Stellung zum Elektronenakzeptorsubstituenten in **63** eine Deprotonierung durchgeführt werden. Dadurch würde eine Eliminierung eingeleitet, die die Abspaltung des Auxiliars vom Rückgrat des Zielpeptides **37** zur Folge hätte.

mit deren Hilfe der Peptidthioester an den nucleophilen *N*-Terminus herangeführt wird. Elektronendonor-substituierte, aromatische Ringsysteme garantieren eine acidolytische Spaltung nach erfolgter Fragmentverknüpfung. Der dadurch bedingte hohe Raumanspruch behindert die Erschließung sterisch anspruchsvoller Verknüpfungsstellen, so dass bisher auf der Seite des nucleophilen Peptids oder auf Seiten des Thioesters immer mindestens ein Glycin vorhanden sein musste. Die harschen Acidolysebedingungen [17, 105] sind zudem nur in Maßen mit post-translationalen Proteinmodifikationen vereinbar, so dass beispielsweise die Verknüpfung phosphorylierter Peptide mittels der erweiterten nativen chemischen Ligation noch nicht beschrieben wurde. Ziel des in der Dissertation zu bearbeiteten Projektes war, diesbezüglich Verbesserungen herbeizuführen. Um eine mildere Abspaltung unter basischen Bedingungen zu gestatten, sollte das neue Auxiliar über einen Elektronenakzeptorsubstituenten verfügen (Abb. 3.1 C). Die dadurch induzierte α -C,H-Acidität würde unter basischen Bedingungen die Abstraktion eines Protons ermöglichen und dadurch zur Abspaltung des Auxiliars mittels einer E1_{cb}-Eliminierung führen (Abb. 3.1 D). Die Konzeption sah durch Wahl eines sterisch anspruchslosen Substituenten weiterhin vor, Hindernisse für der Verknüpfungsreaktion abzubauen. Dadurch sollte die Möglichkeit eröffnet werden, auch Verknüpfungsstellen ohne Glycin erschließen zu können. Zunächst sollte die Synthese eines Nitroauxiliars bewerkstelligt werden, da die NO₂-Gruppe aufgrund der sehr starken Elektronenakzeptoreigenschaften und des geringen Raumanspruches die Anforderung des Konzeptes am ehesten erfüllen würde.

Die Ligations-Entschwefelungs-Strategie ist eine weitere Möglichkeit Peptide

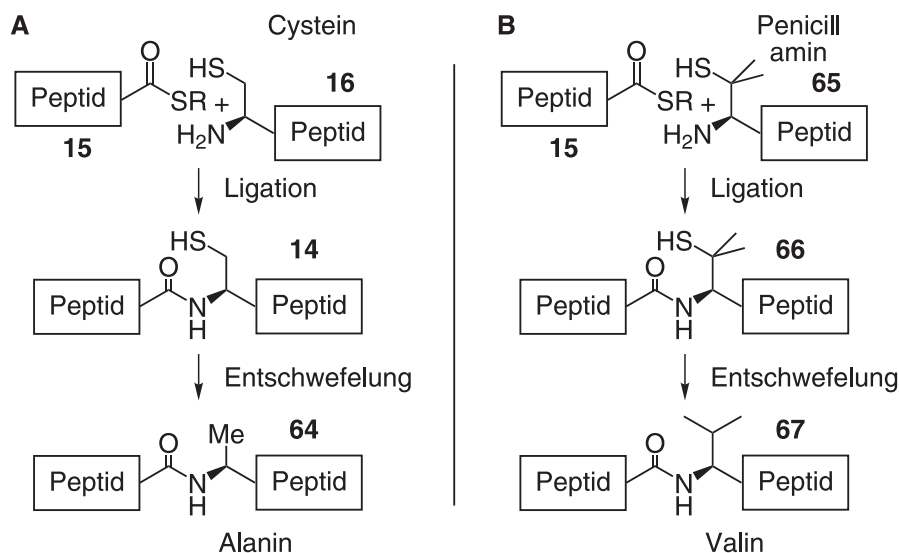


Abbildung 3.2: Ligations-Entschwefelungs-Strategie. **A:** Nach einer konventionellen Ligation mit Cysteinpeptiden **16** kann durch eine Entschwefelung eine Verknüpfungsstelle mit Alanin zugänglich gemacht werden. **B:** Bei analogem Verlauf könnten bei einer Fragmentknüpfung mit einem Penicillaminpeptid (**65**) Valin-Ligationsprodukte **67** erhalten werden.

ohne Cystein, mit Hilfe konvergenter Methoden zugänglich zu machen. Alanin-Verknüpfungsstellen konnten durch die Desulfurierung von Cysteinpeptiden erschlossen werden, die das Produkt einer konventionellen nativen chemischen Ligation waren (Abb. 3.2 **A**). [144] Die Verwendung von β -Mercaptophenylalanin diente der Etablierung von phenylalanin-haltigen Kupplungsstellen. [18, 38] Die Desulfurierung konnte durch Anwendung metall-basierter Bedingungen erfolgen. [144] Die damit verbundenen unerwünschten Nebeneffekten ließen sich durch Anwendung metall-freier, radikal-basierter Bedingungen umgehen. [141] In der vorliegenden Arbeit sollte darauf aufbauend eine Ligation mit Penicillamin als Vorläufer des häufig in Proteinen auftretenden Valins (6,7 % Gehalt [47]) entwickelt werden (Abb. 3.2 **B**). Diese zusätzliche Möglichkeit hydrophobe Verknüpfungsstellen erschließen zu können, würde beispielsweise die Synthese von membran-durchspannenden Proteinen oder von "Leucin-Zipper"-Transkriptionsfaktoren in erheblichem Maße vereinfachen.

Wong und Brik *et al.* entwickelten mit der zucker-vermittelten [24] bzw. der Ligation mit Seitenkettenauxiliar [92] weitere Verfahren, mit denen eine Vielzahl verschiedener Peptidbindung erschlossen werden konnte. Anders als bei der nativen chemischen Ligation machte der Transfer des Acylrestes hierbei die Ausbildung eines macrocyclischen Übergangszustandes notwendig. Das Thiol-Thioester-Gleichgewicht wurde von Mercaptofunktionen bedient, die innerhalb der Peptidsequenz

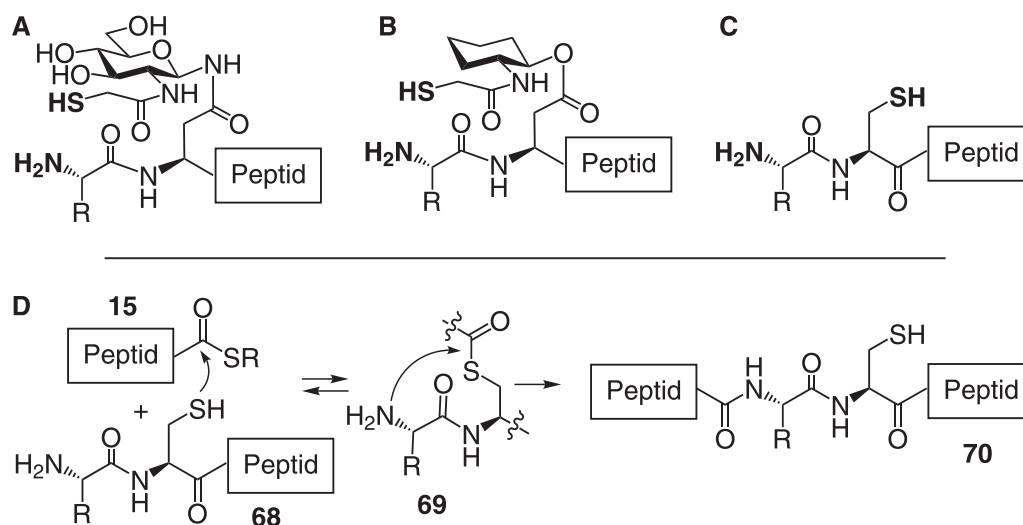


Abbildung 3.3: **A:** Zucker-vermittelte Ligation nach Wong *et al.* [24]; **B:** Ligation mit Seitenkettenauxiliar nach Brik *et al.* [92]; **C:** Prinzip einer möglichen Ligation mit sequenz-internem Cystein am Beispiel eines Peptides mit Cystein in der zweiten Position. Zunächst fände dabei die Einstellung eines Thiol-Thioester-Gleichgewichtes zwischen **15** und **68** statt. Die Verschiebung des Acylrestes zum *N*-Terminus würde dann die Ausbildung eines macrocyclischen Übergangszustandes erforderlich machen, bevor das Ligationsprodukt **70** gebildet werden könnte.

durch Anknüpfung an einer Aminosäureseitenkette platziert waren (Abb. 3.3 **A**, **B**). Als ein weiterer Bestandteil der Doktorarbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss ein einfaches sequenz-internes Cystein (Abb. 3.3 **C**) in einer dazu analogen Ligationsreaktion (Abb. 3.3 **D**) ausübt.

4 Diskussion und Ergebnisse

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

4.1.1 Konzept

Die Kondensation ungeschützter Peptidfragmente hat durch die Entwicklung der nativen chemischen Verknüpfung entscheidende Impulse erhalten.[41] Dieses leistungsfähige Verfahren basiert auf der Reaktion eines Peptidthioesters mit einem Cysteinylpeptid, die in wässrigen Lösungen in hohen Ausbeuten verläuft. Allerdings ist eine allgemeine Anwendbarkeit in zweierlei Hinsicht begrenzt. Zum einen erweisen sich die eingeschränkten Synthesemöglichkeiten von Peptidthioestern als Hemmnis (siehe Abschnitt 2.6). Zum anderen limitiert das seltene Vorkommen des Cysteins (ca. 1,3 %) eine allgemeine Anwendbarkeit der Reaktion.[47]

Die Verwendung *N*-terminal angeknüpfter Auxiliare in der erweiterten nativen chemischen Verknüpfung ist eine Möglichkeit, um das seltene Cystein durch andere Aminosäuren zu ersetzen.[28, 105, 74, 104, 17, 95] Die Auxiliare verfügen über eine Thiofunktion, die im zunächst ablaufenden reversiblen Thiolaustausch das Peptidthioesterfragment an die *N*-terminale Aminogruppe heranzuführt. Über einen 5- bzw. 6-gliedrigen Übergangszustand kann die Aminfunktion das gebildete Thioesterintermediat nucleophil angreifen, wodurch die Peptidbindung geknüpft wird. Zumeist gewährleisten elektronenreiche aromatische Ringsysteme eine acidolytische Ablösung des Auxiliars nach erfolgter Ligation, wobei jedoch teilweise sehr harsche Reaktionsbedingungen nötig sind. Aufgrund dessen sind Peptide mit Proteinmodifikationen wie Lipidierungen oder Phosphorylierungen unter Umständen nicht zugänglich. Durch den hohen Raumanspruch der Molekülgruppen können nur Verknüpfungsstellen mit mindestens einem Glycin erschlossen werden (vgl. Abschnitt 2.9) So konnten mittels des von Dawson *et al.* entwickelte Benzylauxiliars Gly-Gly-, Ala-Gly-, Phe-Gly- sowie Lys-Gly-Peptidbindung mit akzeptablen Ergebnissen geknüpft werden.[105, 104] Auch gelang die Ligation an Gly-Ala- und Gly-Gln-Positionen [105, 104, 143], wohingegen der Versuch Leu-Gly-, Ala-Ala-, oder Gly-Val-Stellen zu erschließen jedoch an der sterischen Hinderung durch die Seitenketten der Aminosäuren scheiterte.[105, 104, 94] Gly-Gly-, Gly-Ala-, Ala-Gly-, His-Gly- und Lys-Gly-Verknüpfungen konnten problemlos mit dem von Kent *et al.* vorgestellten Phenethyltyp-Auxiliar hergestellt werden.[17, 91, 29] Allerdings konnten damit keine Ser-Gly-, Leu-Gly- und Ala-Ala-Peptidbindungen zugänglich gemacht werden. [94, 95]

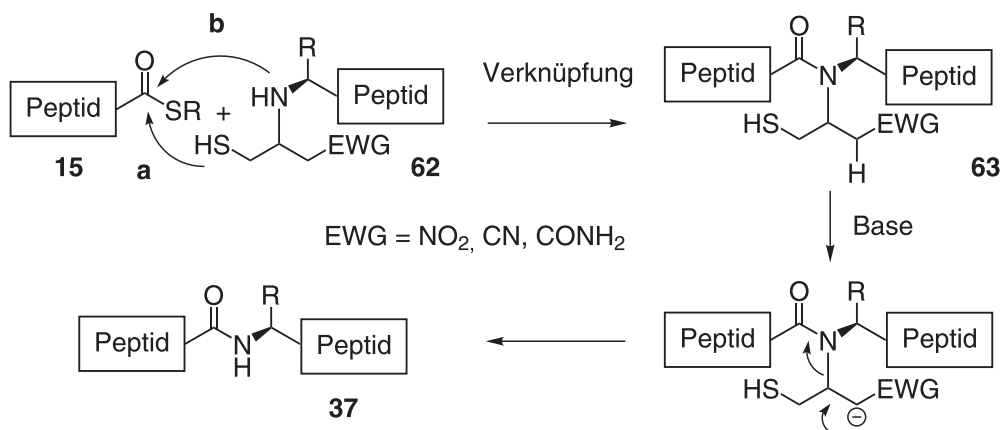


Abbildung 4.1: Konzept der erweiterten nativen chemischen Verknüpfung mit basenlabilen Auxiliaren. Zunächst erfolgt die Ligation des Thioesterpeptides **15** mit dem Auxiliarpeptid **62** durch den reversiblen Thiolaustausch (a) und den nachfolgenden $S \rightarrow N$ -Acyltransfer (b). Die Ablösung des Auxiliars wird durch die Deprotonierung des zur elektronenziehenden Gruppe α -ständigen Kohlenstoffatoms initiiert. Bei der somit eingeleiteten E1_{cb} -Eliminierung wird das Zielpeptid **37** freigesetzt.

Sterisch anspruchsvollere Verknüpfungen sollten durch eine Verringerung des sterischen Anspruches des Auxiliars möglich sein. Zudem sind mildere Bedingungen für die Abspaltung nach der Ligation wünschenswert. Diese beiden Kriterien können in dem in Abbildung 4.1 veranschaulichten Konzept eines basenlabilen Auxiliars erfüllt werden. Zunächst erfolgt analog der nativen chemischen Ligation die Verknüpfung des Peptidthioesters **15** und des Auxiliarpeptides **62** durch einen reversiblen Thiolaustausch (a in Abb. 4.1) und dem nachfolgenden $S \rightarrow N$ -Acyltransferschritt (b in Abb. 4.1). Die elektronenziehende Gruppe des Auxiliars in **63** ermöglicht die Abstraktion des α -ständigen Protons unter mild basischen Bedingungen. Dadurch wird eine E1_{cb} -Eliminierung induziert, die das Zielpeptid **37** als Fluchtgruppe freisetzt. Der sterische Anspruch elektronenziehender Gruppen (EWG) ist im Vergleich zu aromatischen Ringsystemen gering. Die erweiterte native chemische Verknüpfung mit einem basenlabilen Auxiliar hätte daher das Potential auch andere Aminosäuren als Glycin an der Ligationsstelle zu tolerieren.

4.1.2 Synthese eines Nitroauxiliarsynthesebausteines

Eine problemlose, basen-induzierte Auxiliarabspaltung sollten Substituenten mit starken Elektronenakzeptoreigenschaften gewährleisten. Mit ihren hohen elektronenziehenden Eigenschaften sticht insbesondere die Nitrogruppe ($\text{EWG} = \text{NO}_2$) hervor, da zu ihr α -ständige Protonen eine hohe Acidität aufweisen. So beträgt der pK_A -Wert von Nitroalkanen etwa 17,0 (in DMSO)[117], wodurch auch die der Abspaltung zugrunde liegende E1_{cb} -Eliminierung leicht induzierbar sein sollte. Die ersten Synthesebemühungen zielten daher auf einen Festphasensynthesebaustein

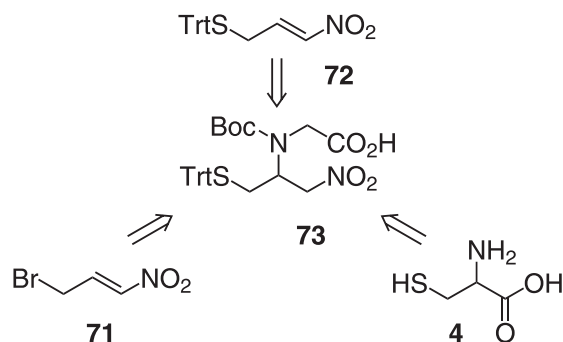


Abbildung 4.2: Strategien für die Synthese eines Nitroauxiliarbausteines.

ab, dessen Aminogruppe mit einem Nitroauxiliar verbunden ist. Für die Synthese des Glycinderivates **73** wurden verschiedene Strategien verfolgt.

Das Nitroolefin **72** könnte in einer Michael-Addition zum Auxiliaraminosäurebaustein ausgebaut werden. Die Synthese dieses Moleküls erscheint besonders attraktiv, da es bereits über alle wichtigen funktionellen Gruppen verfügt. Somit wäre auch die Addition an ungeschützten *N*-Termini festphasengebundener Peptide denkbar, wodurch die Synthese auxiliar-modifizierter Peptide erheblich vereinfacht wäre.

Bei Rückgriff auf das Nitroolefin **71**[147] könnte zunächst ebenfalls eine Michael-Addition erfolgen. Danach würde in einer S_N -Reaktion das Bromid durch Tritylmercaptan nucleophil ersetzt und die sekundäre Aminofunktion mit einer Boc-Schutzgruppe blockiert werden.

Nach Reduktion der Carboxylgruppe von Cystein **4** zum Alkohol, kann dieser nach Aktivierung in eine Nitrogruppe überführt werden.[87] Der Glycinteil wird durch Substitution desamins an α -Bromessigsäure eingeführt.

Versuche zur Synthese des Michael-Akzeptorsystems **72**

Bromessigsäurebromid **74** wurde mit *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid in Gegenwart von DIPEA zunächst zum Weinrebamid **75** umgesetzt. Es folgte eine nucleophile Substitution, in der das Bromatom in **75** durch Triphenylmethylmercaptan ausgetauscht wurde. Daran schloss sich die Reduktion des Weinrebamids **76** zum Aldehyd **77** an, welches sich während der chromatographischen Reinigung als instabil erwies. Die Reaktion zwischen **77** und Nitromethan erfolgte daher ebenfalls ohne vorherige Aufreinigung. Diese C-C-Bindungsknüpfung, die auch als Nitroaldol- oder Henry-Reaktion [93] bekannt ist, lieferte ähnlich einer Aldoladdition den Nitroalkohol **78**. Die Eliminierung von Wasser aus **78** sollte den Michael-Akzeptor **72** bereitstellen, für den im weiteren Verlauf die Umsetzung mit Aminosäurebausteinen wie z. B. Glycinmethylester geplant war. Die Überführung der Hydroxylfunktion in **72** in eine Fluchtgruppe unter basischen Bedingungen sollte eigentlich eine gleichzeitig Eliminierung bewirken. Diese Reaktion gelang jedoch nicht. Die Aufklärung des Reaktionsgeschehens wurde dadurch erschwert,

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

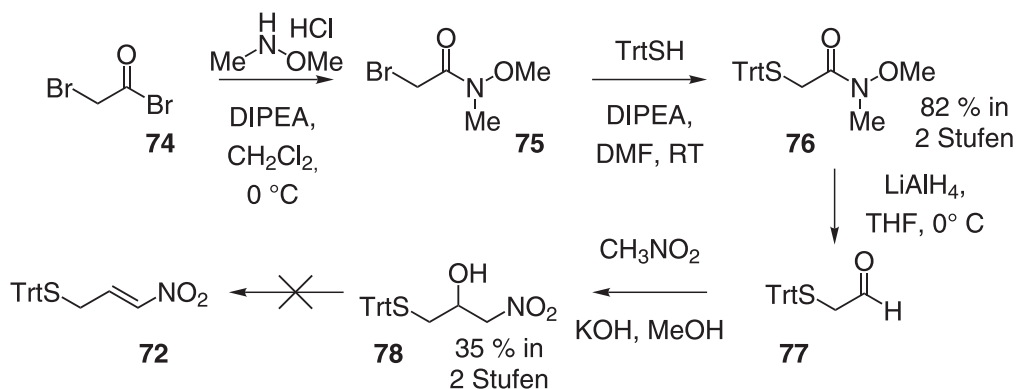


Abbildung 4.3: Syntheseroute zur Herstellung von (3-Nitroallyl)(trityl)sulfan **72**.

dass neben hauptsächlich zersetztem Material, nur geringe Menge eines einheitlichen Produktes gebildet wurden. Nach dessen aufwendiger Reinigung wurde versucht, die Identität des Produktes mit Hilfe von NMR-Spektroskopie zu ermitteln. Eine tiefer gehende Analyse scheiterte aber an der Zersetzung der Substanz bei Raumtemperatur.

Syntheserversuche mittels des Michael-Akzeptorsystems **71**

Da die Synthese des Michael-Akzeptors **72** nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnte, wurde eine alternative Route gewählt, deren Schlüsselbaustein das bereits literaturbekannte Nitroolefin **71** war.[147] Dazu wurde das Bromatom in **79** zunächst durch eine Nitrogruppe ersetzt und dann eine elektrophile Addition von Brom an die Doppelbindung durchgeführt. Bei der anschließende Eliminierung von

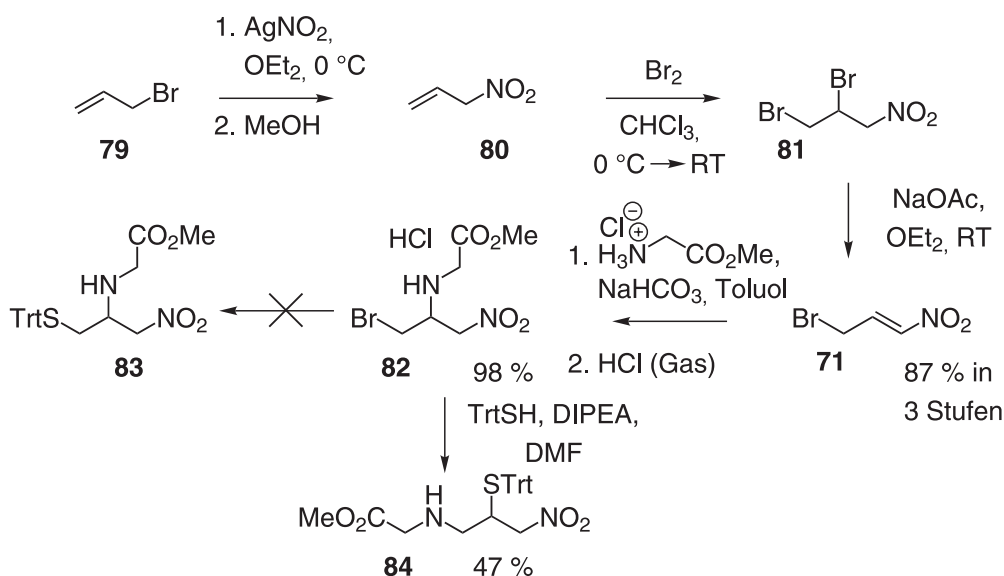


Abbildung 4.4: 3-Brom-1-nitroprop-1-en **71** als Schlüsselbaustein.

HBr entstand selektiv der Michael-Akzeptor **71** aufgrund des Elektronenzuges der NO₂-Gruppe.

Bei der Identifizierung von Reaktionsbedingungen für die anschließende Addition des Methylesters von Glycin an den Michael-Akzeptor **71** wurde verschiedene Lösungsmittel (Toluol, CH₂Cl₂, THF, Diethylether), Basen (NaHCO₃, Pyridin, Triethylamin) und Stöchiometrien (ein bzw. zwei Äquivalente Base) untersucht. Der dünn-schicht-chromatographische Vergleich der verschiedenen Bedingungen ergab, dass das beste Ergebnis hinsichtlich der Bildung des Additionsproduktes mit der Kombination von Toluol als Lösungsmittel und zwei Äquivalenten NaHCO₃ als Base erzielt werden konnte. Spuren von Wasser im Reaktionsgemisch stellten das Lösen der als Salze vorliegenden Edukte und damit das Freisetzen des Aminosäureesters aus dessen Hydrochlorid sicher. Die Isolierung des Reaktionsproduktes gelang durch dessen Fällung als Hydrochlorid **82**.

Im nächsten Schritt war die Substitution des verbleibenden Bromatoms in **82** durch das Schwefelnucleophil Tritylmercaptan geplant. Bei der sorgfältigen Auswertung des ¹H, ¹³C-HMBC-Korrelationsspektrums des Reaktionsproduktes zeigte sich, dass anstelle der Verbindung **83** das Konstitutionsisomer **84** entstanden war. Der für die Aufklärung der Struktur relevante Abschnitt des HMBC-Spektrums und die konkurrierenden Strukturen sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Das eindeutige Auftreten des Kreuzsignales zwischen dem Kohlenstoffatom C-7 und dem Proton H-5 (Abb. 4.6 e) bewies das Vorliegen der Verbindung **85**. Der geringe Unterschied der chemischen Verschiebung der Kohlenstoffatome C-1, C-3 und C-4 verleitete zwar zu Fehlinterpretationen, aber auch hier konnten die der Struktur **84** zugehörigen ¹H, ¹³C-Fernkopplungen zwischen C-4 und H-3 (Abb. 4.6 b) bzw. C-3 und H-4 (Abb. 4.6 d) identifiziert werden. Kreuzsignale zwischen C-5 und H-3 (Abb. 4.6 a) bzw. C-7 und H-4 (Abb. 4.6 f) fehlten. Somit musste das Vorliegen der Zielverbindung **83** ausgeschlossen werden.

Der Grund für diesen ungeplanten Reaktionsverlauf war wahrscheinlich, dass das Bromatom in **82** nicht direkt vom angreifenden Thiolat substituiert wurde.

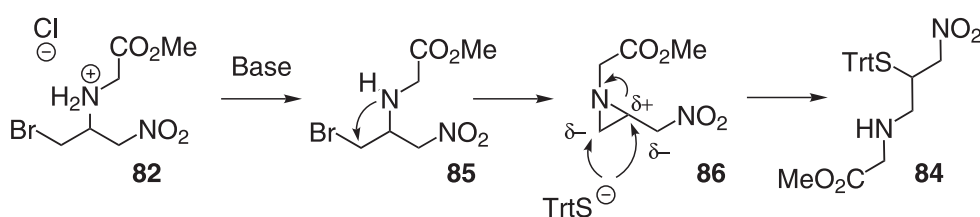


Abbildung 4.5: Putativer Mechanismus der Bildung des Konstitutionsisomers **84**. Die Freisetzung des Glycinderivates **85** aus dem Hydrochlorid **82** ermöglichte die nucleophile Substitution des Broms durch die benachbarte sekundäre Aminfunktion. Das dadurch entstehende Aziridin **86** wurde von Triphenylmethylmercaptan wieder geöffnet. Durch den elektronischen Einfluss der Nitrogruppe in **86** wurde das Schwefelnucleophil jedoch an die sterisch stärker gehinderte Position dirigiert und es entstand das nicht erwünschte Produkt **84**.

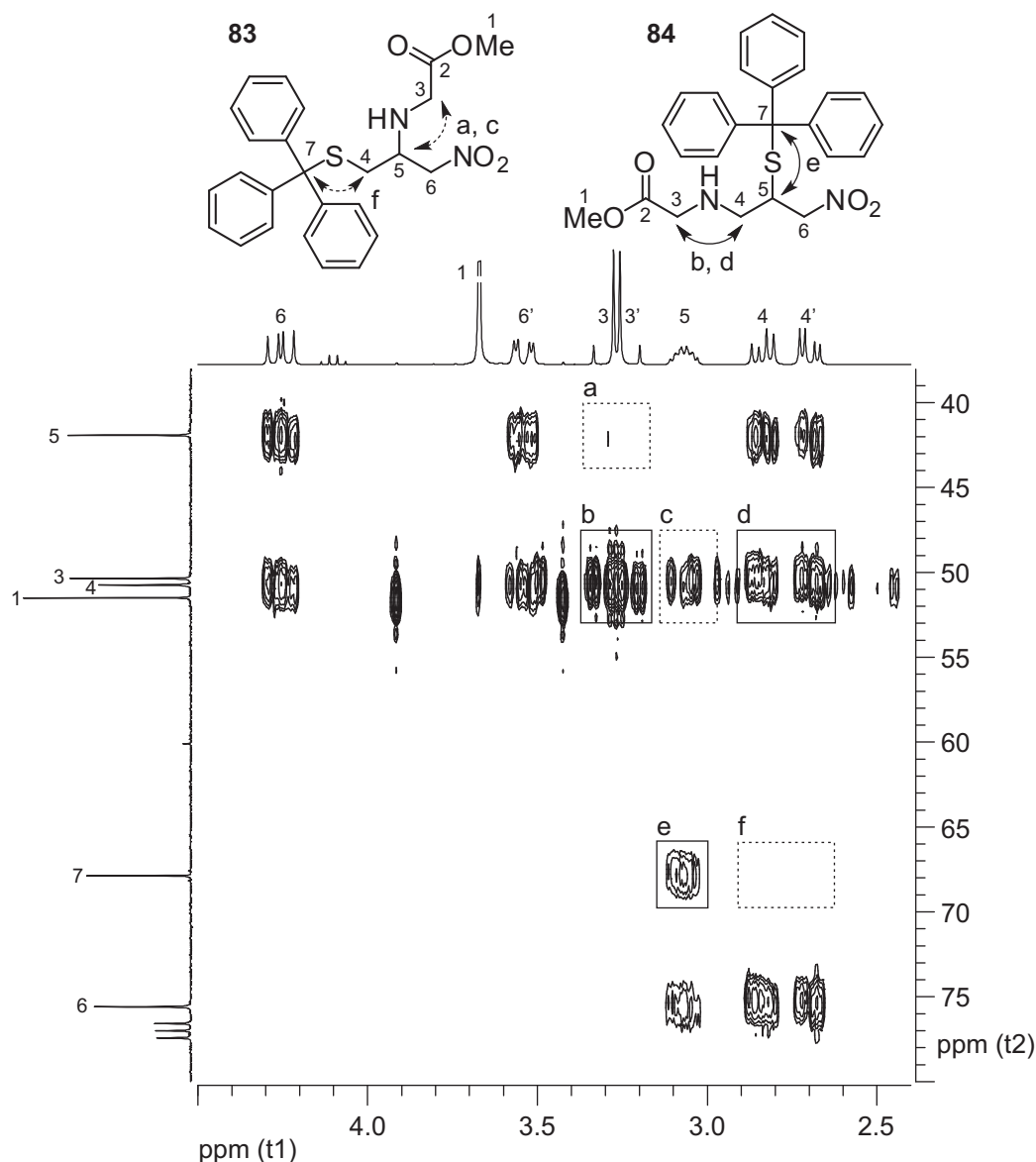


Abbildung 4.6: HMBC-Spektrum von Verbindung **84**. Die Zielverbindung **83** und das tatsächliche Produkte **84** sind oben abgebildet. Es sind diejenigen Fernkopplungen markiert, die für die Verbindungen charakteristisch sind bzw. wären. Im HMBC-Spektrum wurden dazu die Regionen gekennzeichnet, in denen Kreuzsignale auftreten bzw. auftreten müssten. Für die gewünschte Verbindung **83** würden Kopplungen zwischen C-5 und H-3 (a), C-3 und H-5 (c) und C-7 und H-4 (f) erwartet (gestrichelt markierte Bereiche). Das im Bereich (c) auftretende Kreuzsignal wurde der Korrelation zwischen C-4 und H-5 in **84** zugeordnet. Weiterhin wurden die Kopplungen zwischen C-4 und H-3 (b), C-3 und H-4 (d) sowie C-7 und H-5 (e) in **84** angezeigt (durchgezeichnet markierte Bereiche).

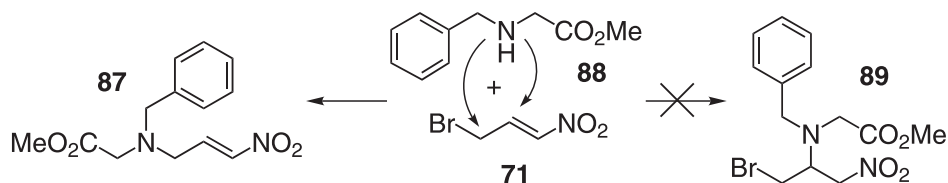


Abbildung 4.7: Reaktion von 3-Brom-1-nitroprop-1-en **71** mit *N*-Benzylglycinmethylester **88**. Die geplante Michael-Addition fand aufgrund sterischer Hinderung nicht statt. Anstelle dessen substituierte das sekundäre Amin **88** selektiv das Bromatom in **71**.

Die Bildung des beobachteten Produktes **84** kann mit der in Abbildung 4.5 dargestellten Reaktionsfolge erklärt werden. Im Hydrochlorid **82** war das Bromatom gegen einen Angriff des sekundärenamins durch dessen Protonierung geschützt. Dies änderte sich sobald die Deprotonierung unter basischen Bedingungen erfolgte. Durch einen nucleophilen Angriff des Stickstoffs auf das benachbarte Halogenid in der Spezies **85** bildete sich durch eine 3-*exo-tet*-Cyclisierung das Aziridin **86**. Vermutlich bewirkte der Nitromethylsubstituent eine Verringerung der Elektrophilie am sterisch stärker gehinderten Zentrum des Tricyclus. Daher erfolgte die Ringöffnung durch den Angriff des Triphenylmethylthiolates an diesem sterisch anspruchsvollen, aber sehr elektrophilen Kohlenstoffatom. Der Glycinmethylesterteil wurde dabei von der 2-Position in **82** in die 3-Position des Nitropropangerüsts **84** verlagert.

Um der Bildung eines beschriebenen Aziridinringes **86** vorzubeugen, musste das sekundäre Amin in **82** in ein tertiäres Amin überführt werden. Die Bedingungen einer *N*-Alkylierung von **82** hätten wieder dessen Cyclisierung nach sich gezogen. Daher wurde versucht, den Methylester von Glycin (primäres Amin) (siehe Abb. 4.4) durch *N*-Benzylglycinmethylester **88** [125] zu ersetzen. Anstelle der Addition desamins an die elektronendefiziente Doppelbindung in **71** erfolgte jedoch wahrscheinlich aufgrund zu großer sterischer Hinderung eine Substitution des Bromides.

Die Regioselektivität des Angriffs von Triphenylmethylmercaptan auf **71** wurde ebenfalls untersucht. Das gewünschte Reaktionsprodukt, das Michael-Akzeptor-System **72**, war bereits Ziel der in Abbildung 4.3 dargestellten Syntheseroute. Die

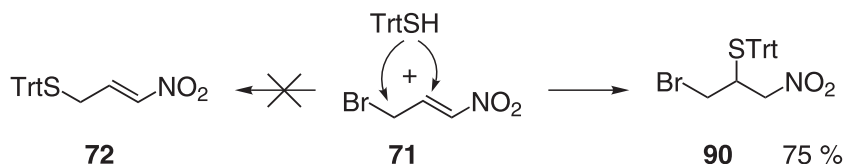


Abbildung 4.8: Reaktion von 3-Brom-1-nitroprop-1-en **71** mit Tritylmercaptan. Im Falle der Reaktion zwischen Triphenylmethylmercaptan und dem Olefin **71** verlief keine S_N -Reaktion, sondern eine Addition an die Doppelbindung. Dabei entstand **90** anstelle der Verbindung **72**.

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

für dessen Entstehung notwendige S_N -Reaktion erfolgte jedoch nicht. Durch eine Michael-Addition an die akzeptorsubstituierte Doppelbindung entstand Verbindung **90** (Abb. 4.8).

Syntheseversuche eines Nitroauxiliars über Nitromethylthiiran

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gefolgert, dass der Angriff durch ein S-Nucleophil auf ein nitromethyl-substituiertes Aziridinintermediat an der sterisch gehinderten Stelle erfolgte. Dies legte den Schluss nahe, dass die Reaktion eines Aminnucleophils mit einem nitromethyl-substituierten Thiiran analog gelingen könnte.

Die für die Synthese durchgeführten Experimente konzentrierten sich zunächst auf das in Abbildung 4.8 gezeigte Bromid **90**. Um einen nucleophilen Angriff des Schwefelatoms auf das benachbarte Halogenid zu ermöglichen (Schritt **b** in Abb. 4.9) war zunächst dessen Deblockierung mit Trifluoressigsäure (Schritt **a** in Abb. 4.9) notwendig. Geplant war, danach die Induktion der Cyclisierung von **91** durch Zugabe des Modellnucleophils *n*-Propylamin herbeizuführen (Schritt **c**). Bei Analyse des Reaktionsproduktes dieser Umsetzung konnte das gesuchte 2-Amino-1-thiol **93** nicht identifiziert werden. Die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums deutete darauf hin, dass **93** neben *n*-Propylamin selbst als Nucleophil in Aktion getreten war (Abb. 4.9). Durch die Reaktion des wesentlich nucleophileren **93** mit dem Thiiran **92** (Schritt **d** in Abb. 4.9) wurde eine Kaskade eröffnet, welche die Bildung verschiedener Oligomere wie **94** zur Folge hatte. Um diesen Reaktionsverlauf zu unterbinden, wurde die Konzentration des Thiirans stark herabgesetzt. Die hoch verdünnte Lösung wurde langsam zu einer hoch konzentrierten Lösung von *n*-Propylamin getropft. Jedoch führte auch diese Verfahrensweise nicht zu dem gewünschten Ergebnis, da keinerlei Produkt isoliert werden konnte.

Weiterhin wurde versucht Nitromethylthiiran **92** ausgehend von Epithiochlorhydrin **95** zu synthetisieren. Eine Reaktion mit Silbernitrit war aufgrund der Zerset-

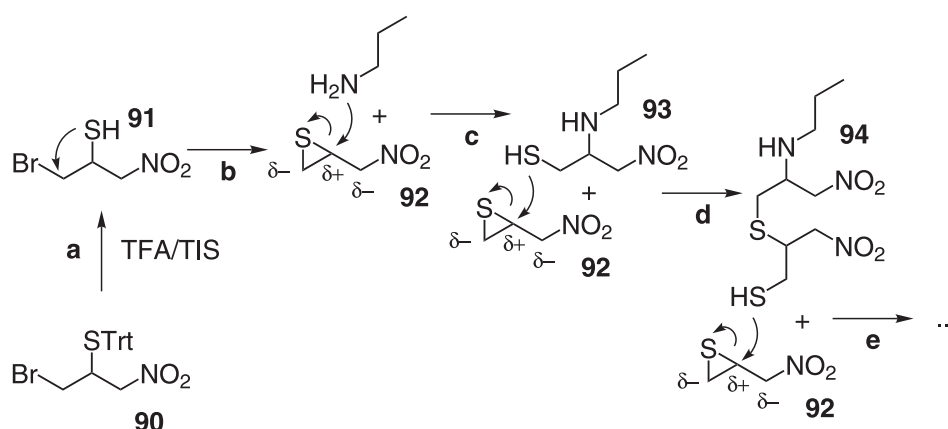


Abbildung 4.9: Synthese von Auxiliaraminosäurebausteinen über 2-Nitromethylthiiran **92**.

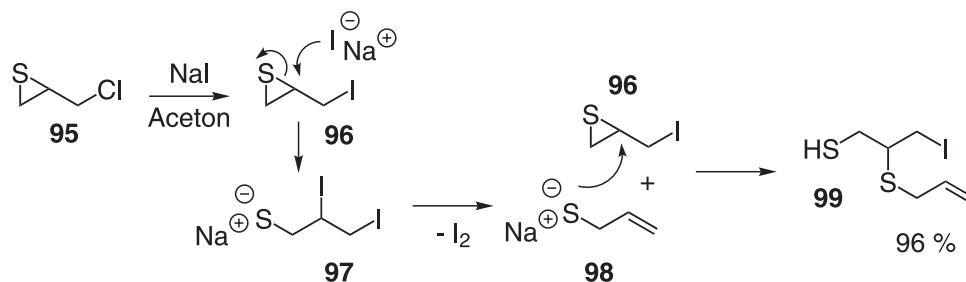


Abbildung 4.10: Verhalten von Epithiochlorhydrin bei Umsetzung mit Natriumiodid. Die Reaktion verlief möglicherweise nach dem beschriebenen Mechanismus. Danach hätte zunächst der Halogenaustausch stattfinden müssen. Anschließend würde durch Natriumiodid ausgelöst eine Ringöffnung die Bildung des geminalen Diiodes **97** zur Folge haben, das einer sofortigen Eliminierung von Iod unlegen wäre. Das hierbei entstandene Allylmercaptan **98** könnte dann ebenfalls als Nucleophil agiert haben. Bei seiner Reaktion mit dem Finkelstein-Produkt **96** wäre das Reaktionsprodukt **99** entstanden. (Die Angabe der Ausbeute beruht auf der angenommenen Stöchiometrie der Reaktion: Epithiochlorhydrin : Natriumiodid = 2 : 3).

zung des Startmaterials nicht möglich. Die Synthese aliphatischer Nitroverbindungen ist auch unter Verwendung von Natriumnitrit möglich, wobei aber Alkyljodide als Startmaterial verwendet werden müssen.[85] Daher sollte Epithiochlorhydrin **95** durch eine Finkelstein-Reaktion zunächst in das entsprechende Iodid **96** überführt werden. Es war jedoch nicht möglich das Epithioiodhydrin **96** herzustellen. Anstelle dessen wurde eine Verbindung isoliert, der nach Interpretation der NMR-Spektroskopie-Daten die Struktur **99** zugeordnet wurde.

Wahrscheinlich verlief die Reaktion zunächst wie in Abbildung 4.10 beschrieben unter Bildung des Finkelstein-Produktes **95**. Danach erfolgte vermutlich durch Natriumiodid ein erneuter Angriff auf das Reaktionsprodukt **95**, der die Öffnung des Thiiranringes herbeiführte. Das dabei gebildete Diiod **97** würde unter Eliminierung von Iod sofort zu Allylmercaptan **98** weiterreagieren. Ein Indiz für diesen Verlauf ist die während der Reaktion eingetretene bräunliche Verfärbung der Reaktionslösung, die im Zuge der Aufarbeitung durch Waschen mit Natriumthiosulfat-Lösung vollständig entfernt werden konnte. Im Vergleich zu Natriumiodid war das gebildete Allylmercaptan **98** das stärkere Nucleophil und durch dessen Angriff auf das Finkelstein-Produkt **96** hätte das Reaktionsprodukt **99** entstanden sein können. Epithioiodhydrin **96** konnte auf diesem Wege nicht erhalten werden.

Thiazolidincarbonsäure als zentraler Synthesebaustein

In einem weiteren Ansatz (Abb. 4.11) wurde versucht, einen mit einem Nitroauxiliar verknüpften Aminosäurebaustein ausgehend von Cystein herzustellen. Diese Syntheseroute bediente sich einer bereits bekannten Strategie zur Herstellung von

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

Biotinderivaten.[87]

Die Blockierung der nucleophilen Thiol- und Aminfunktion innerhalb des geplanten Auxiliarbausteines **104** wurde durch deren Einbeziehung in ein Thiazolidinringsystem gewährleistet. Diese Schutzgruppe hat sich in der konsekutiven nativen chemische Verknüpfung mehrerer Peptidfragmente als nützlich erwiesen.[6] Ihre Entfernung gelingt in wässrigen Puffersystemen unter leicht sauren Bedingungen durch ein Behandlung mit *O*-Methylhydroxylamin.

Für die Synthese wurde Cystein **4** durch Umsetzung mit Formaldehyd in die Thiazolidincarbonensäure **100** überführt. Im folgenden Schritt wurde **100** mit Bromessigsäure-*tert*-butylester *N*-alkyliert. Dem Auftreten von Mehrfachalkylierung durch die nucleophile Veresterung der Carbonsäurefunktion wurde durch den Einsatz eines Unterschusses an Alkylierungsreagenz vorgebeugt. Die *N*-alkylierte Thiazolidincarbonensäure **101** wurde nunmehr reduziert. Dazu wurde die freie Carbonsäurefunktion in einen Aktivester überführt und dieser im Anschluss mit Natriumborhydrid selektiv in den Alkohol **102** umgewandelt, dessen Identität mittels ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektroskopie verifiziert wurde.

Die Synthese des Iodids **103** war mit Schwierigkeiten verbunden. Viele der gängigen Methoden zur Überführung primärer Alkohole in die entsprechenden Iodide wie etwa die Aktivierung in Kombination mit einer sich anschließenden Finkelstein-Reaktion oder die Umsetzung mit Triphenylphosphan und Iod schlugen fehl. Es gelang hingegen das Iodid **103** durch eine abgewandelte Mitsunobu-Reaktion herzustellen, bei der Methyljodid als Iodidquelle diente.[52] Die Substitution des Iodides in **103** gelang durch die Reaktion mit Natriumnitrit in DMF in Gegenwart von Phloroglucinol. Auch die Synthese des Nitroderivates **104** gelang. Allerdings wurde von dieser Reaktion lediglich ein Testansatz durchgeführt und das Produkt konnte nur mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

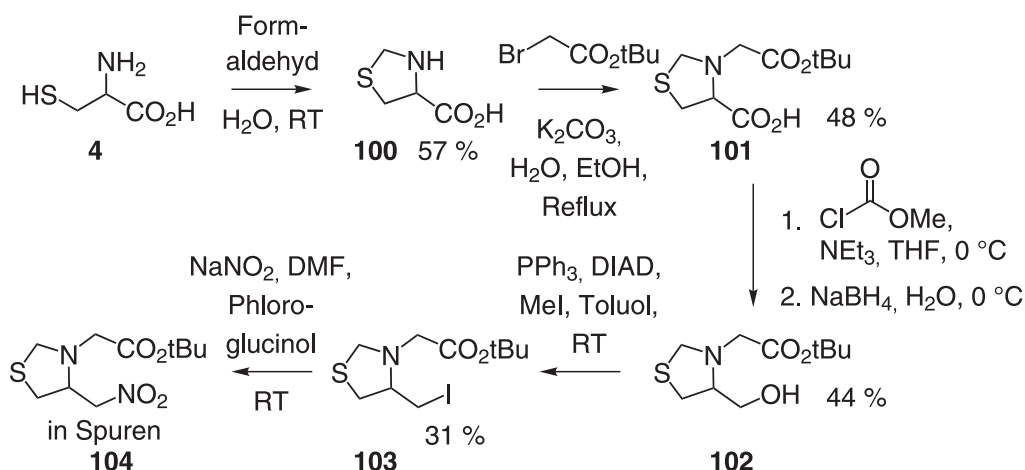


Abbildung 4.11: Synthese eines Auxiliarbausteines ausgehend von Thiazolidincarbonensäure **100**.

Zusammenfassung

Die Synthese eines nitro-substituierten Auxiliars erwies sich als sehr schwierig. Die Nitrogruppe behinderte durch ihre elektronischen Einflüsse die erfolgreiche Durchführung der geplanten Synthesen. Von den in Abbildung 4.2 gezeigten Strategien konnte lediglich die von Cystein ausgehende Syntheseroute erfolgreich beschritten werden. Dabei erfolgte die Einführung der Nitrogruppe erst zu einem späten Zeitpunkt. Die Weiterentwicklung dieser Strategie und alle weiteren Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines wurden aufgrund der bei der gleichzeitigen Untersuchung des Nitrilauxiliar gewonnen Erkenntnisse (Abschnitt 4.1.3 und 4.1.4) nicht weiter verfolgt.

4.1.3 Synthese eines Nitrilauxiliarbausteines

Auch die Nitrilgruppe kommt als elektronenziehende Gruppe für das in Abbildung 4.1 dargestellte Konzept in Frage. Allerdings bewirkt ein Nitril einen im Vergleich zur Nitrogruppe geringeren Elektronenzug. Der pK_A -Wert von Cyanolalkanen beträgt etwa 32,0 (in DMSO)[117], daher ist für die Deprotonierung eines α -ständigen Protons eine stärkere Base erforderlich. Die der Abspaltung zugrunde liegende $E1_{cb}$ -Eliminierung könnte auch durch eine Temperaturerhöhung beschleunigt werden, so dass die Freisetzung des Zielpeptides **37** trotz der geringeren C,H-Acidität erfolgreich durchgeführt werden kann.

Im Gegensatz zum nitro-substituierten Michael-Akzeptor **72** war die Synthese eines entsprechenden Cyanoolefins **108** literaturbekannt.[135] Diese basierte auf der radikalischen Addition von *S*-Benzoylphenylselenosulfid **106** an Allylcyanid (Abb. 4.12). Danach sollte das Olefin **108** einer Michael-Addition mit *n*-Propylamin als Modellsubstanz unterzogen werden. Die Reaktion verlief jedoch nicht in gewünschter Weise, da anstelle der Doppelbindung in **108** die Thioesterfunktion durch das Amin angegriffen wurde. Hierbei entstand Benzoesäurepropylamid und 4-Mercaptobut-2-enitril **110**.

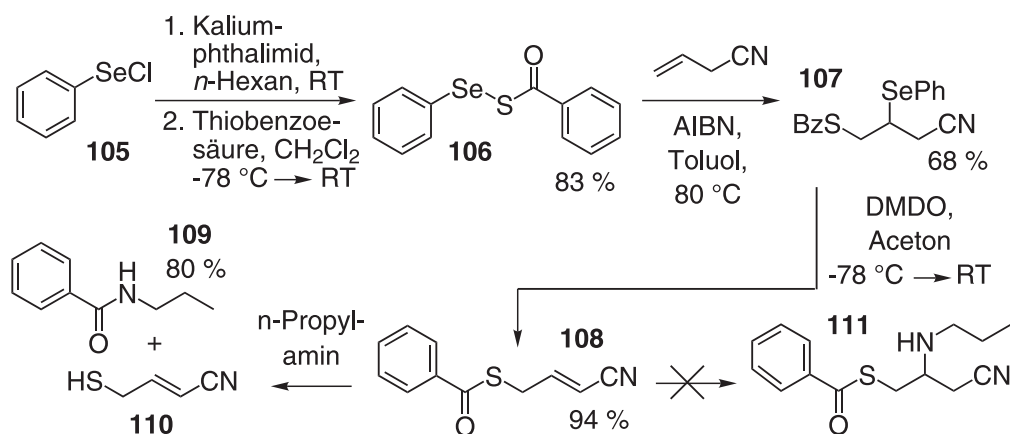


Abbildung 4.12: Synthese von *S*-Benzoylmercaptobutenitril

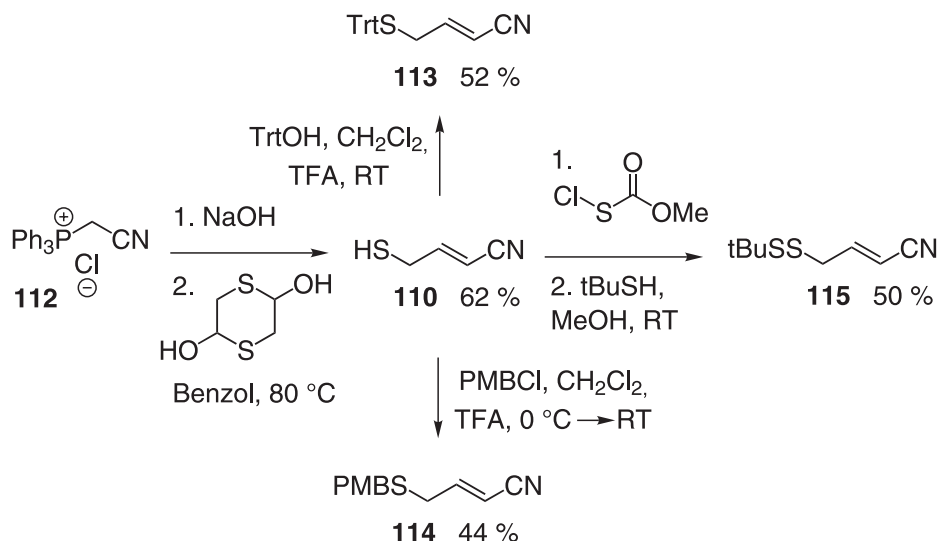


Abbildung 4.13: Synthese geschützter Mercaptobutenitrile

Die Benzoylgruppe war für diese Synthesestrategie somit nicht geeignet und musste durch eine gegenüber Nucleophilen stabile Schutzgruppe ersetzt werden. Einen direkten Zugang zum Olefin **110** bot eine Wittig-Reaktion zwischen dem durch die Deprotonierung von Cyanomethyltriphenylphosphoniumchlorid **112** gewonnenen Ylid und 1,4-Dithian-2,5-diol (Abb. 4.13). [26] Die Blockierung der Sulfanylfunktion als säureempfindlicher Triphenylthioether gelang durch die Reaktion mit Triphenylmethylalkohol unter sauren Bedingungen. Alternativ konnte die Sulfanylfunktion als ein ebenfalls säurelabiler *para*-Methoxybenzylthioether blockiert werden. Der Synthesebaustein **110** wies zugleich elektrophile und nucleophile Eigenschaften auf. Die Einführung der PMB-Schutzgruppe erfolgte zur Vermeidung von Nebenreaktionen daher nicht unter Zuhilfenahme einer Base. Anstelle dessen wurde das Thiol **110** in einer TFA-beihaltenden Lösung mit *p*-Methoxybenzylchlorid umgesetzt. Als weitere Möglichkeit wurde ein unsymmetrisches *tert*-Butyldisulfid als Schutzgruppe für die Sulfanylfunktion in **110** eingeführt. Die hierfür nötigen Schritte waren die selektiv mit Mercaptanen verlaufende Umsetzung mit Methoxycarbonylsulfenylchlorid und die Thiolyse des dabei entstandenen Reaktionsproduktes durch 2-Methyl-2-propanthiol.

Zunächst wurde das triphenylmethyl-geschützte Cyanoolefin **113** in einer Modellreaktion mit *n*-Propylamin als Michael-Akzeptor untersucht. Anstelle der gewünschten Addition kam es zum einen zu einer Verschiebung der Doppelbindung (Struktur **113'**) und zum anderen zur Einstellung eines neuen *E/Z*-Verhältnisse zwischen **E-113** und **Z-113** (Abb. 4.14, Tab. 4.1). Es war zunächst überraschend, dass die Konjugation zur Nitrilgruppe unter verhältnismäßig mild basischen Bedingungen aufgehoben werden konnte. Wahrscheinlich ermöglichte die Bildung von **Z-113** und **113'** die Reduzierung von sterischer Hinderung am Zentrum der Tritylgruppe.

Die Addition des *n*-Propylamins konnte nicht durchgeführt werden. Vermutlich

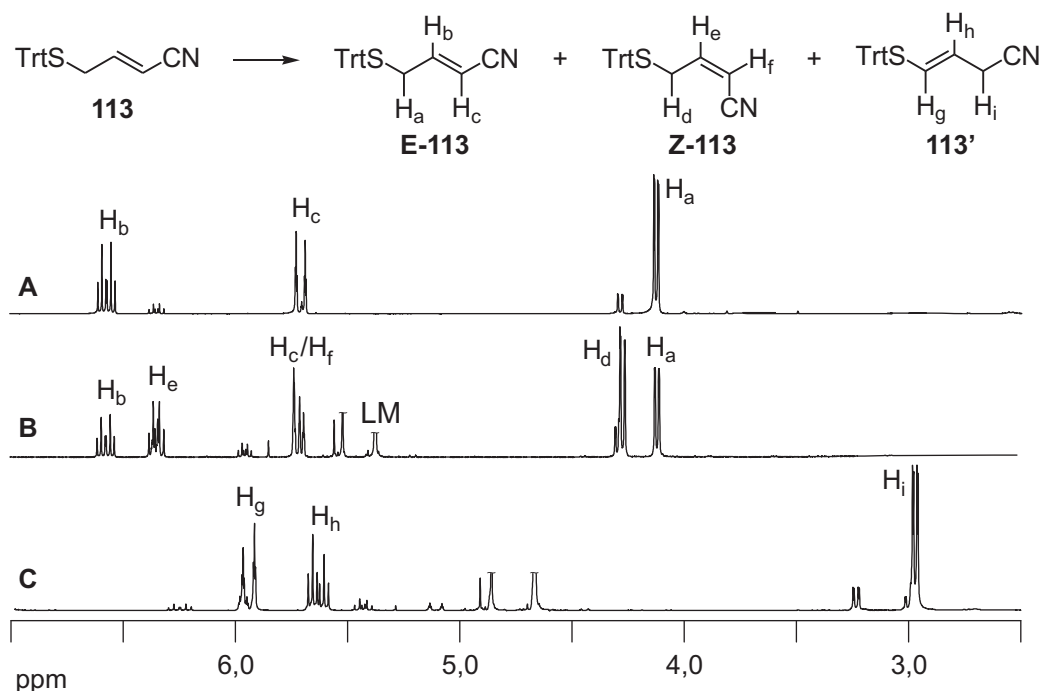


Abbildung 4.14: ^1H -NMR Spektren isomerer *S*-Tritylmercaptobutenitrile. Bei dem Versuch *n*-Propylamin an die Doppelbindung des Michael-Akzeptors **113** zu addieren, wurde lediglich deren Isomerisierung beobachtet. Die dargestellten ^1H -NMR-Spektrenausschnitte zeigen die Signale der Allylsysteme von **E-113**, **Z-113** und **113'**. Nicht zu den Verbindungen gehörende Signale sind zur Verbesserung der Anschaulichkeit verdeckt. **A:** **113** (vor Reaktion); **B:** Gemisch von **E-113** und **Z-113** (säulenchromatographisch separierbar von **113'**); **C:** **113'**.

behinderte die Tritylschutzgruppe durch ihren hohen Raumanpruch den Angriff des Aminnucleophils auf die Doppelbindung von **113**. Auch durch Verlängerung der Reaktionszeit (bis zu 2 Wochen), Erhöhung der Temperatur (Reflux) und

Tabelle 4.1: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten isomerer *S*-Tritylmercaptobutenitrile **113**. Die Werte sind den ^1H -Spektren **A**, **B**, **C** in Abb. 4.14 entnommen. $H_a - H_i$ entsprechen den Protonen in Abb. 4.14.

Proton	δ [ppm]	J_1 [Hz]	J_2 [Hz]	Proton	δ [ppm]	J_1 [Hz]	J_2 [Hz]
H_a	4,1	7,2	1,5	H_f	5,6	10,7	1,1
H_b	6,5	16,1	7,2	H_g	5,9	15,3	1,5
H_c	5,6	16,1	1,5	H_h	5,6	15,3	5,9
H_d	4,2	7,9	1,1	H_i	2,9	5,9	1,5
H_e	6,3	10,7	7,9				

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

Verwendung verschiedener Lösungsmittel (MeOH, CH₃CN und Toluol) konnte keine Reaktion herbeigeführt werden.

Die Michael-Addition an das *p*-methoxybenzyl-geschützte Mercaptobutennitril **114** wurde zunächst ebenfalls mit *n*-Propylamin als Modellnucleophil untersucht. Die PMB-Schutzgruppe hat einen geringeren Raumanspruch als die Triphenylmethylschutzgruppe, aber auch hier wurde die Bildung von Doppelbindungsisomeren offensichtlich. Deren Trennung war nicht möglich, aber mit Hilfe von ¹H-Kernresonanzspektroskopie konnten alle Bestandteile des Isomerengemisches identifiziert werden. (Abb. 4.15; Tab. 4.2). Aufgrund der geringeren sterischen Hinderung der benzylichen Schutzgruppe konnten alle vier möglichen Isomere einschließlich des *Z*-konfigurierten Olefins **Z-114'** gebildet werden (Abb. 4.15 oben). Neben dem isomerisierten Startmaterial, das zur Hälfte zurückgewonnen wurde, konnte nach 4-tägiger Reaktion in ethanolischer Lösung unter Reflux auch das gewünschte Additionsprodukt mit einer Ausbeute von 33 % isoliert werden.

Das akzeptorsubstituierte Olefin **114** sollte anschließend mit Glycinmethylester anstelle des Propylamins zur Reaktion gebracht werden. Es konnte hierbei jedoch keinerlei Umsetzung erzielt werden. Auch mit anderen Estern des Glycins blieb die Michael-Addition erfolglos. Während der Reaktion des Benzylesters wurde bei einer dünnschichtchromatographischen Überprüfung des Reaktionsverlaufes die Freisetzung von Benzylalkohol augenscheinlich. Dieser Befund deutete daraufhin, dass die eingesetzten Glycinerester unter Bildung von Diketopiperazin dimerisierten. Daraufhin wurde Glycin direkt mit dem Michael-Akzeptor-System **114** umgesetzt. Die Reaktion verlief unter Bildung des Additionsproduktes **117**, wobei eine sehr gute Ausbeute erzielt werden konnte (Abb. 4.16).

Die Übertragung dieser Bedingungen auf das triphenylmethyl-geschützte Olefin **114** war wahrscheinlich aufgrund der sterischen Hinderung nicht möglich. Ebenso konnte das als Disulfid blockierte Olefin **115** nicht umgesetzt werden. Anzunehmen ist, dass die *tert*-Butyldisulfidgruppe den Bedingungen der Additionsreaktion (2 äq. NaOH, 80 °C, 24 Stunden) nicht stand hielt, woraufhin Zersetzung eintrat.

Tabelle 4.2: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten isomerer *S*-PMB-Mercaptobutennitrile **114**. Die Werte sind den ¹H-Spektren **A**, **B**, **C** in Abb. 4.15 entnommen. H_a – H_m entsprechen den Protonen in Abb. 4.15.

Proton	δ [ppm]	J ₁ [Hz]	J ₂ [Hz]	Proton	δ [ppm]	J ₁ [Hz]	J ₂ [Hz]
H _a	4,1	7,1	1,5	H _g	6,6	15,1	1,6
H _b	6,8	16,1	7,1	H _h	5,9	15,1	5,8
H _c	5,8	16,1	1,5	H _i	4,2	5,8	1,6
H _d	4,4	7,9	1,1	H _k	6,5	9,3	1,5
H _e	6,6	10,7	7,9	H _l	6,0	9,3	6,8
H _f	5,8	10,7	1,1	H _m	4,2	6,8	1,5

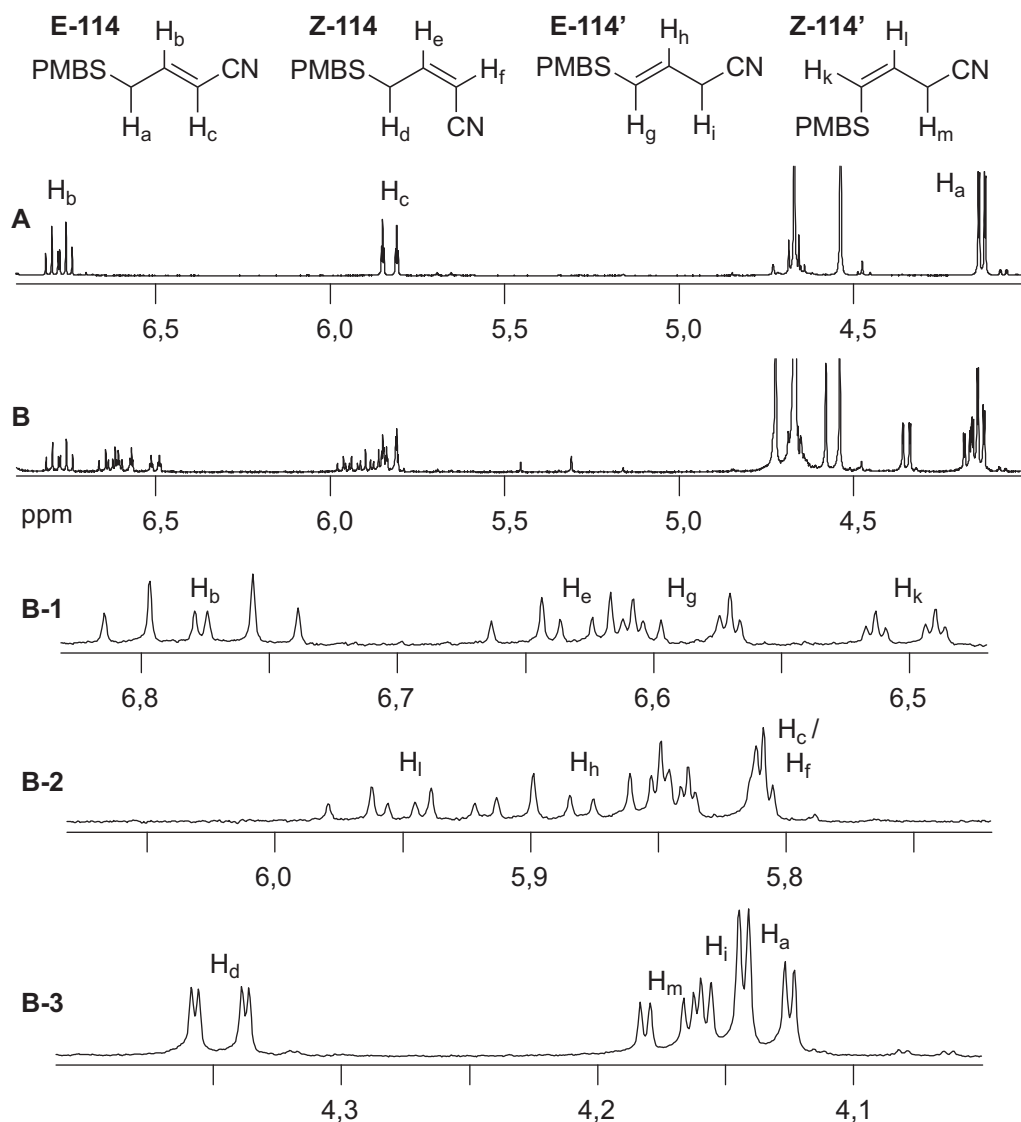


Abbildung 4.15: ^1H -NMR Spektrum isomerer S-PMB-mercaptobutenitrile: Bei der Umsetzung von *n*-Propylamin mit dem *p*-methoxybenzylgeschützten Mercaptobutenitril **114** trat neben der Bildung des Additionsproduktes zu großen Teilen die Isomerisierung des Startmaterials auf. Das Gemisch der vier dabei gebildeten Olefine war chromatographisch nicht separierbar. Die gezeigten Spektren bilden lediglich den für die Allylsysteme relevanten Bereiche ab. Es sind die ^1H -Spektren vor (**A**) und nach der Reaktion (**B**) gezeigt. Das ^1H -Spektrum des Olefingemisches wurde in die relevanten Bereiche (**B-1** - **B-3**) untergliedert. Die Signalzuordnung basiert auf den ermittelten Kopplungskonstanten (Tabelle 4.2). Die Spezies lagen im ungefähren Verhältnis 10:7:7:5 = **E-114**:**Z-114**:**E-114'**:**Z-114'** vor.

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

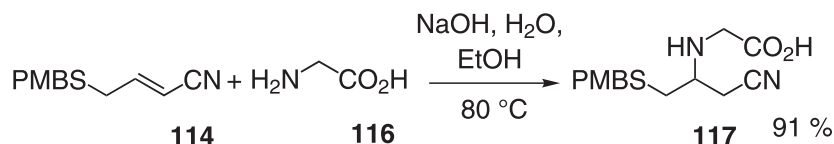


Abbildung 4.16: Synthese des *p*-methoxybenzyl-geschütztem Nitrilauxiliarglycins (H-Nag(PMB)-OH (**117**)). Die Identität des Produktes wurde mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (incl. ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR) sichergestellt.

Bevor der Synthesebaustein **117** in der Festphasenpeptidsynthese Verwendung fand, musste die α -Aminofunktion geschützt werden (Abb. 4.17). Dies erfolgte in Form der Boc-Schutzgruppe, die bei Verwendung des Bausteines **118** (Boc-Nag(PMB)-OH; Nag: Nitrilauxiliarglycin) in der linearen Festphasenpeptidsynthese vor der Ablösung des Peptides vom Trägerpolymer keines separaten Deblockierungsschrittes bedarf. Als weiterer Baustein wurde das Fmoc-geschützte Monomer **120** (Fmoc-Nag(PMB)-OH) hergestellt und nach Deblockierung dessen *p*-Methoxybenzylschutzgruppe zusätzlich das als Ethyldisulfid geschützte Monomer **121** (Fmoc-Nag(SET)-OH). Zur Evaluierung der Stabilität des Auxiliarglycin-molekülgerüsts (siehe Abschnitt 4.1.4) wurde weiterhin Ac-Nag(PMB)-OH **119** ausgehend von **117** durch Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin bereitgestellt.

Die C-N-Bindungen von Carbamaten und Amiden haben aufgrund von Mesomerie Doppelbindungscharakter. Dadurch ist die freie Drehbarkeit um diese Bindungen einschränkt. Das tertiäre Amid **119** und die tertiären Carbamate **118**, **120** und **121** liegen infolgedessen als cis-trans-Isomere vor. Bei der Untersuchung des NMR-Verhaltens dieser Verbindungen wurde dieser Sachverhalt durch das

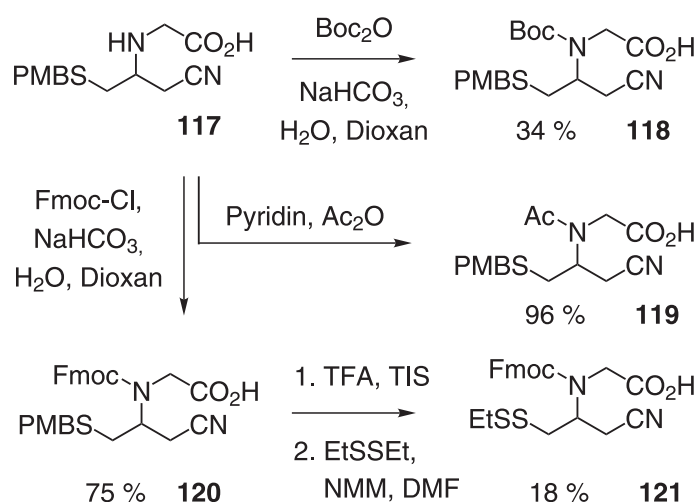


Abbildung 4.17: Synthese geschützter Nitrilauxiliarglycine. Es wurden keine Optimierungen der Syntheseausbeuten vorgenommen.

Auftreten doppelter Signalsätze insbesondere in den Kohlenstoff-NMR-Spektren deutlich. Auch in den Protonen-NMR-Spektren trat dieser Effekt auf. Anhand charakteristischer Signale konnten die jeweiligen Verhältnisse der Diastereomere bestimmt werden. Eine direkte Zuordnung zu cis- bzw. trans-Isomer ist jedoch auf dieser Basis nicht möglich.

4.1.4 Synthese eines Modellpeptides

Synthese mit Boc-Nag(PMB)-OH als terminalem Baustein

Für die Sequenz des Modellpeptides zur Untersuchung der cystein-freien Ligation der cystein-freien Ligation wurde die Sequenz H-Nag-RAEYS-OH gewählt. Die Assemblierung des Peptides erfolgte zunächst basierend auf der Fmoc/*t*Bu-Strategie

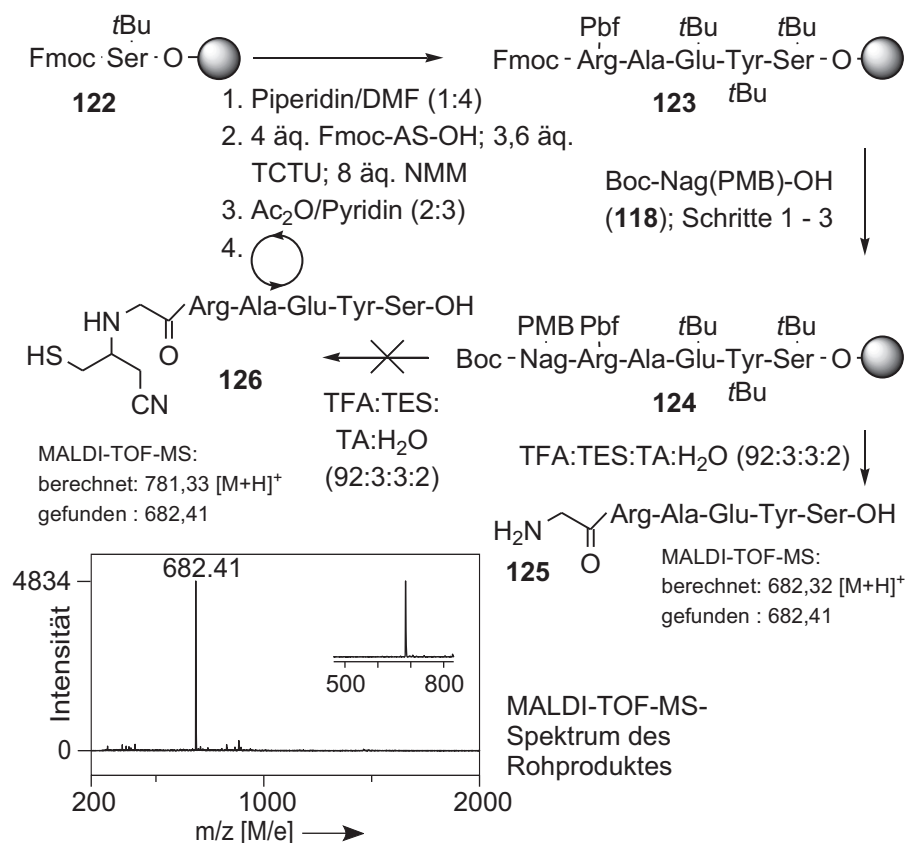


Abbildung 4.18: Synthese des Modellpeptides mit Boc-Nag(PMB)-OH **118**. Die Sequenz des Peptides **123** wurde mittels Fmoc/*t*Bu-Strategie an einem Wang-Harz aufgebaut. Anschließend erfolgte die Kuppelung des Monomers **118**. Nach der TFA-vermittelten Abspaltung vom polymeren Träger konnte anstelle des Modellpeptides **126** nur das auxiliar-freie Peptid **125** mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektroskopie detektiert werden.

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

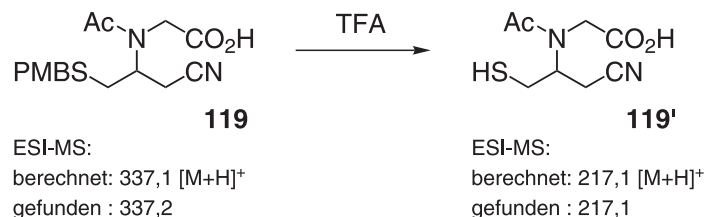


Abbildung 4.19: Verhalten des acetylierten Nitrilauxiliars **119** gegenüber TFA. Der PMB-Thioether in **119** wird durch TFA bereits nach einer Minute gespalten, wohingegen das Nitrilauxiliar intakt bleibt. Das *N*-acetylierte *S*-deblockierte Glycinderivat **119'** konnte selbst einer Stunde noch detektiert werden.

an einem Wang-Harz (Abb. 4.18). Das doppelt säure-labil geschützte Auxiliarglycin Boc-Nag(PMB)-OH (**118**) wurde als terminaler Baustein angeknüpft und dann die Abspaltung vom Trägerpolymer durchgeführt. Bei der Untersuchung des erhaltenen Rohpeptides konnte lediglich das Peptid H-GRAEYS-OH (**125**) detektiert werden (MALDI-TOF-MS-Spektrum in Abb. 4.18).

Als unerwünschte Nebenreaktionen in einem der drei Schritte (Kupplung, Capping oder Loslösung von Trägerharz) war die Abspaltung des Auxiliars aufgetreten. Die Kupplung des Bausteines **118** war unter Zuhilfenahme von *N*-Methylmorpholin als Base durchgeführt worden. Da die Abspaltung der Auxiliargruppe unter basischen Bedingungen verläuft, wurde untersucht, ob bei Verzicht auf eine Hilfsbase die Synthese des Auxiliarpeptides **126** gelingt.

Dazu wurde das Monomer **118** mit Hilfe von Diisopropylcarbodiimid aktiviert, in einen 1-Hydroxybenzotriazol-Aktivester überführt und mit dem Peptidylharz **123** zur Reaktion gebracht. Weiterhin wurde auf einen Capping-Schritt verzichtet, um den Einfluss des hierbei verwendeten Pyridins auszuschließen. Das auf diese Weise gewonnene Peptidrohmaterial wurde nach dessen Abspaltung abermals mit Hilfe von MALDI-TOF-MS-Spektroskopie untersucht, wobei ebenfalls der Verlust des Auxiliars festgestellt wurde.

Nunmehr wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der ungewollten Abspaltung des Auxiliars und der TFA-vermittelten Ablösung des Peptides vom polymeren Träger bestand. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe der sekundären Aminofunktion während der Deblockierung des Peptides wurde als sicher angenommen. Die Spaltung von *p*-Methoxybenzylthioethern hingegen erforderte nach Literaturangaben drastische Bedingungen (HF; TFA, Reflux) oder die Zuhilfenahme von Schwermetallzusätzen während der Säurebehandlung.[55] Es wurde daher davon ausgegangen, dass die in Abbildung 4.18 genannten Bedingungen eventuell keine Spaltung des *p*-Methoxybenzylthioethers in **124** bewirken würden. Aufgrund dessen war die Ursache für den Verlust des Auxiliars somit in der Deblockierung der α -Aminofunktion in **124** zu suchen. Da Acetylgruppen gegen die Einwirkung von Säure inert sind, wurde das Nitrilauxiliarglycingerüst hinsichtlich seiner Säurestabilität anhand der Reaktion des acetylierten Derivates **119** in TFA untersucht

(Abb. 4.19). Entgegen der zuvor getroffenen Annahme über die Säurestabilität des *p*-Methoxybenzylthioethers in **119** zeigten HPLC-MS-Untersuchungen auf, dass bereits nach Ablauf von nur einer Minute eine nahezu vollständige Spaltung erfolgt war. Das freiwerdende Thiol **119'** war hingegen selbst nach Ablauf einer Stunde noch detektierbar.

Hieraus wurde geschlussfolgert, dass die vorzeitige Abspaltung im Zusammenhang mit der Entfernung der *N*-terminalen Schutzgruppe stand. Durch die unter Acidolysebedingungen erfolgte Deblockierung von Boc-Amino- und PMB-Thiol-schutzgruppe wurde das Auxiliarsystem labilisiert. Die Acetylierung der Aminogruppe hingegen verlieh der Molekülgruppe ausreichende Stabilität, um den Bedingungen der TFA-Behandlung stand zu halten. Die säure-resistente Fmoc-Gruppe konnte auch nachträglich in Lösung durch Behandlung mit Piperidin entfernt werden.[120] Daher wurde diese Schutzgruppe für die weiteren Experimente gewählt.

Synthese des Modellpeptides mittels Fmoc-on/off Strategie

Durch die Untersuchung der Säurestabilität von **118** wurde festgestellt, dass das Auxiliargerüst bei Säurebehandlung am α -Aminostickstoff verblieb, wenn dieser

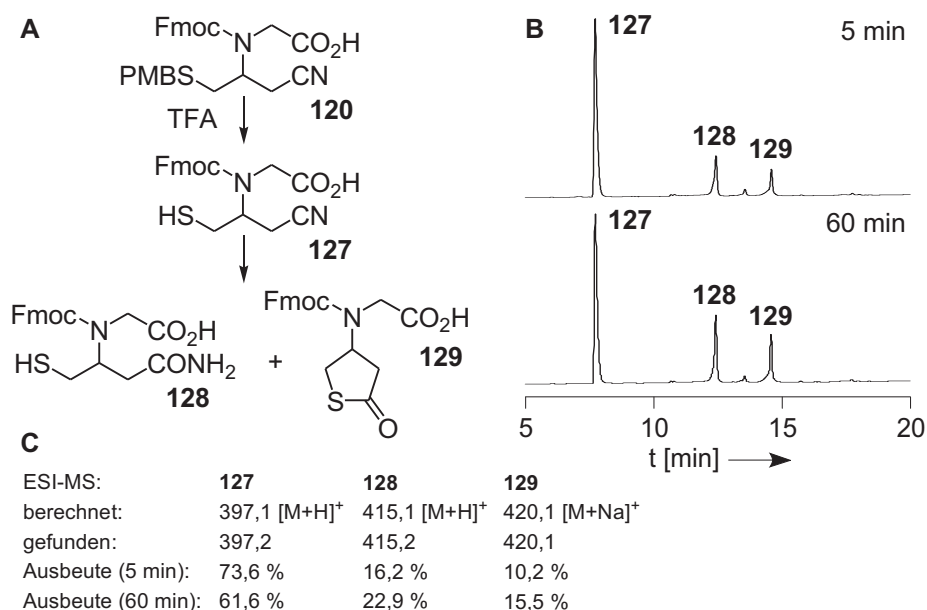


Abbildung 4.20: Verhalten von Fmoc-Nag(PMB)-OH gegenüber TFA. **A:** Schon nach kurzer TFA-Behandlung war der vollständige Verlust der Benzylthioetherschützgruppe zu verzeichnen. Weiterhin fand die Bildung der beiden Strukturen **128** und **129** nach dem in Abb. 4.21 gezeigten Mechanismus statt. **B:** HPLC-Spuren nach 5 und 60 Minuten TFA-Einwirkung. (HPLC-Bedingungen: Gradient 9; $\lambda = 254$ nm) **C:** ESI-MS-Daten und Ausbeuten nach 5 bzw. 60 Minuten.

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

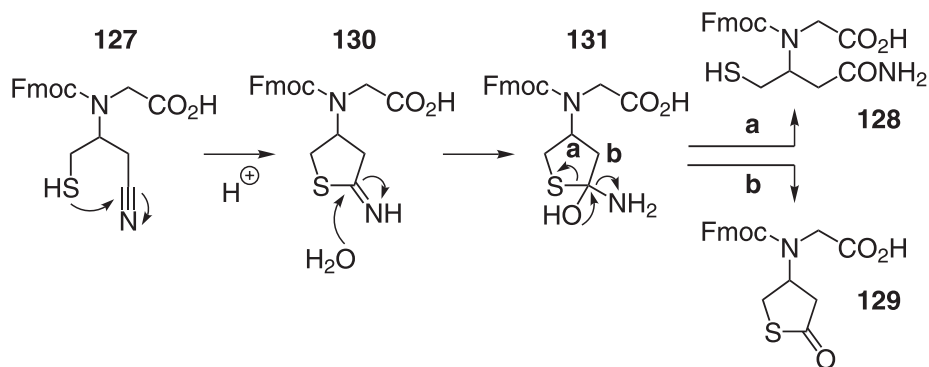


Abbildung 4.21: Angenommener Mechanismus der Bildung von Amidauxiliar- und Thiolactonstruktur. Die freie Thiolfunktion in **127** kann in einer 5-*exo-dig*-Cyclisierungsreaktion die Nitrilgruppe angreifen. Dieser Vorgang wird durch eine terminale Protonierung des Nitrils erleichtert. Der cyclische Imidothioester **130** unterläuft eine Addition von Wasser, wobei das reaktive Tetraederintermediat **131** entsteht. Durch den Austritt des Schwefel- (**a**) bzw. des Stickstoffatoms (**b**) wird das Butyramid **128** bzw. das Thiolacton **129** gebildet.

als Amid gebunden vorlag. Um den *S*→*N*-Acyltransferschritt vollziehen zu können, musste das sekundäre Amin deblockiert vorliegen. Da eine simultan zur TFA-vermittelten Deblockierung stattfindende Abspaltung der *N*-terminalen Aminoschutzgruppe mit dem Verlust des Auxiliars einher ging, wurde der *N*-Terminus des Modellpeptides mit der säure-stabilen Fmoc-Gruppe ausgestattet. Es war jedoch nicht klar, welches Verhalten die basen-labile Auxiliargruppe gegenüber dem Fmoc-Deblockierungsreagenz Piperidin zeigen würde. Ein mögliches dahingehendes Auftreten von Komplikationen bei Verwendung des Fmoc-geschützten Derivates Fmoc-Nag(PMB)-OH **120** wurde in Kauf genommen. Vor dessen Einsatz als Festphasensynthesebaustein erfolgte die Untersuchung der Stabilität des Auxiliars gegenüber Piperidin/DMF (1:4) anhand des Boc-geschützten Bausteines **118**. Auch nach zehn-minütiger Inkubationszeit konnte jedoch keinerlei Veränderung festgestellt werden.

Weiterhin wurde das Verhalten von **120** gegenüber TFA untersucht (Abb. 4.20). Abermals konnte festgestellt werden, dass der *p*-Methoxybenzylthioether der Einwirkung der Säure nicht standhielt und nach kurzer Zeit vollständig gespalten war. Zudem wurde augenscheinlich, dass das hierbei gebildete *S*-deblockierte Monomer Fmoc-Nag-OH **127** Folgereaktionen unterlag. Die Bildung der Strukturen **128** und **129** ist durch den nachfolgend beschriebenen und in Abbildung 4.21 gezeigten Mechanismus zu erklären. Es erfolgte vermutlich zunächst ein nucleophiler Angriff der deblockierten Sulfanylfunktion in **127** auf die durch TFA protonierte benachbarte Nitrilgruppe. Der dabei gebildete Imidothioester **130** ging danach durch eine 1,2-Addition von Wasser in das tetraedrale Intermediat **131** über. Dieses reagierte entweder zum Amid **128** oder zum Thiolacton **129**, wobei zum einen das Schwefel- (**a**) oder zum anderen das Stickstoffatom (**b**) bei der Bildung

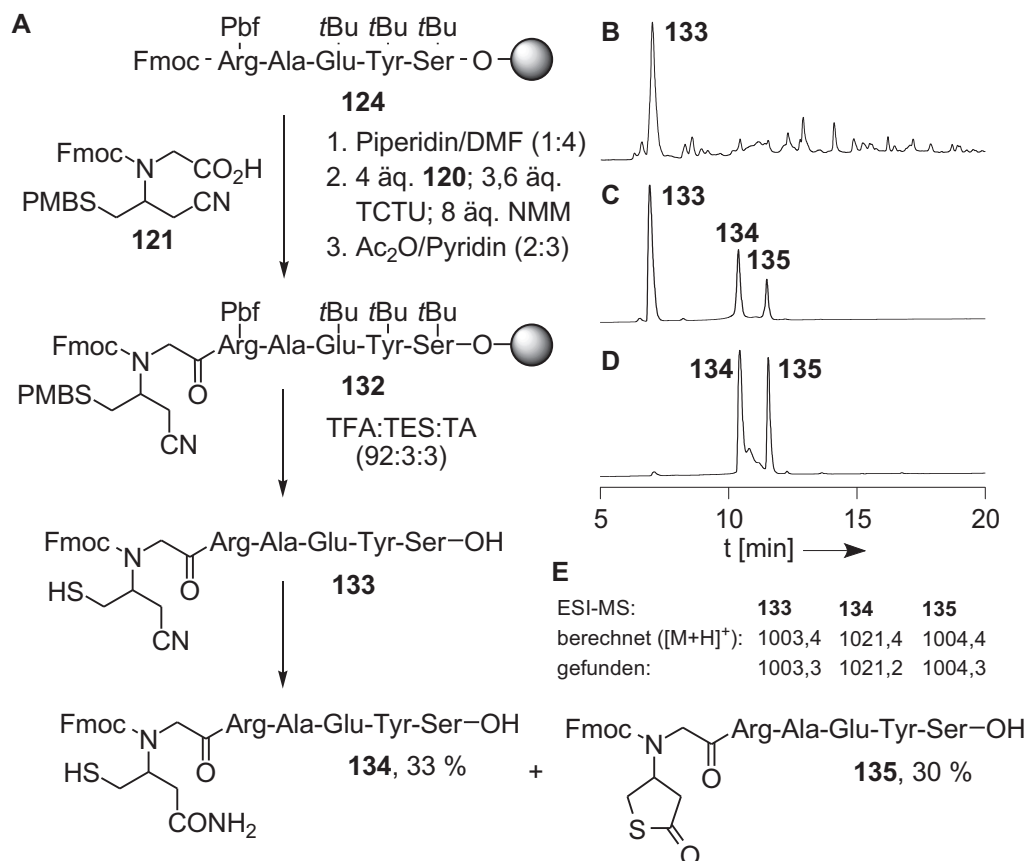


Abbildung 4.22: Synthese des Modellpeptides mit Fmoc-Nag(PMB)-OH **120**. **A:** Nach Synthese und Abspaltung des *N*-terminal Fmoc-geschützten Modellpeptides **133** erfolgte dessen Reinigung. Dabei zeigte sich, dass das Butyronitrilauxiliar Folgereaktionen unterlag, in denen das Butyramid **134** und das Thiolacton **135** gebildet wurden. **B:** HPLC nach Abspaltung vom Festphasensynthescharz. **C:** HPLC-Spur nach präp. Reinigung; Das Zielpeptid **133** ist durch **134** und **135** verunreinigt. **D:** HPLC-Spur der Produktfraktion nach 48 Stunden; Das Zielpeptid wurde komplett in das Thiolacton **135** und das Butyramid **134** umgewandelt. (HPLC-Bedingungen: Grad. 8; $\lambda = 210$ nm). **E:** ESI-MS-Daten von **133**, **134** und **135**. Die Ausbeuteangaben entsprechen der Mengen an isoliertem Produkt.

der C-O-Doppelbindung weichen musste. Zudem konnte eine Zunahme des Amides **128** und des Thiolactones **129** beobachtet werden (Abb. 4.20 **B/C**).

Trotz dieser Nebenreaktionen wurde das Monomer **120** für die Synthese eines Modellpeptides verwendet und die wahrscheinliche Bildung entsprechender Peptidnebenprodukte bei Abspaltung des Modellpeptides Kauf genommen. Nach der Ablösung vom polymeren Träger beinhaltete das isolierte Rohmaterial zum größten Teil das gewünschte Fmoc-Nag-RAEYS-OH **133**. Die präparative Reinigung des Peptides gelang jedoch nicht, da die Nitrilgruppe auch in den HPLC-Eluenten

einer durch die benachbarte Thiofunktion katalysierte Umwandlung unterlag. Die Produktfraktionen des gereinigten Peptides **133** waren immer durch die Amidauxiliarspezies **134** und das thiolacton-verknüpfte Peptid **135** verunreinigt (Abb. 4.22 B). Nach Ablauf von 48 Stunden war das Peptid **133** überhaupt nicht mehr detektierbar, da dessen vollständige Konvertierung in das Amidauxiliarpeptid **134** bzw. die Thiolactonspezies **135** erfolgt war (Abb. 4.22 C). Die beschriebenen Folge- bzw. Nebenreaktionen fanden somit auch unter schwach sauren Bedingungen im wässrigen Medium statt.

Peptidsynthese mit Fmoc-on/off Strategie und blockiertem Thiol

Die Synthese eines Nitrilauxiliarmodellpeptides unter Verwendung des Fmoc-geschützten Monomers Fmoc-Nag(PMB)-OH **120** scheiterte daran, dass die Reinigung des Peptides vor der Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe fehl schlug. Da die Sulfanylfunktion nach ihrer Deblockierung als Nucleophil in Aktion treten konnte, wurde das benachbarte Nitril entweder in ein primäres Amid konvertiert oder es erfolgte die Cyclisierung eines fünf-gliedrigen Thiolactons. Die Möglichkeit eines nucleophilen Angriffs der Auxiliarthiofunktion auf die benachbarte Nitrilgruppe sollte nunmehr durch die Verwendung einer Disulfidschutzgruppe unterbunden werden. Der nächste Versuch zur Synthese eines Modellpeptides wurde aufgrund dessen unter Verwendung von Fmoc-Nag(SET)-OH **121** durchgeführt. Das *N*-terminal blockierte Peptid Fmoc-Nag(SET)-RAEYS-OH **136** konnte nach der Assemblierung der Sequenz problemlos vom Syntheseharz abgespalten und aufgereinigt werden. Die nachfolgende Fmoc-Abspaltung erfolgte durch die Behandlung mit 10% Piperidin in wässriger Lösung und wurde durch Zugabe von Ameisensäure beendet. Die Einwirkung der Base hatte jedoch auch zur Folge, dass neben der Fmoc-Gruppe das Auxiliar vom Peptid abgespalten wurde, so dass zusätzlich zum Zielpeptid H-Nag(SET)-RAEYS-OH **137** auch Fmoc-GRAEYS-OH **138** und H-GRAEYS-OH **139** gebildet wurden. Das beste Ergebnis hinsichtlich der Ausbeute von **137** konnte hierbei nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur erzielt werden. Bei $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ lag bei verlangsamter Reaktionsgeschwindigkeit ungefähr das gleiche Produktverhältnis vor, wohingegen eine Temperaturerhöhung auf $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ die ungewollte Abspaltung des Auxiliars verstärkte.³

Nunmehr sollte die Fähigkeit des *S*-geschützte Nitrilauxiliarpeptides **137** zur Ligation mit Peptidthioestern überprüft werden. Dazu wurde das Peptid mit dem Peptidthioester H-LYKAG-SPAA **140** in einem Phosphatpuffer (100 mM) bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zur Bildung reaktiverer Thioesterspezies und zur Reduktion der Disulfidgruppe in **137** wurde Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz (MES-Na, 20 mM) zugegeben.

Die Bildung eines Verknüpfungsproduktes konnte jedoch nicht beobachtet werden. Der Ligationspuffer enthielt nach kurzer Zeit lediglich den Thioester des Mercaptoethansulfonates und das auxiliar-freie Peptid **125**. Um externe Einflüsse auszuschließen, wurde das Peptid **137** nach dieser Feststellung ohne die Re-

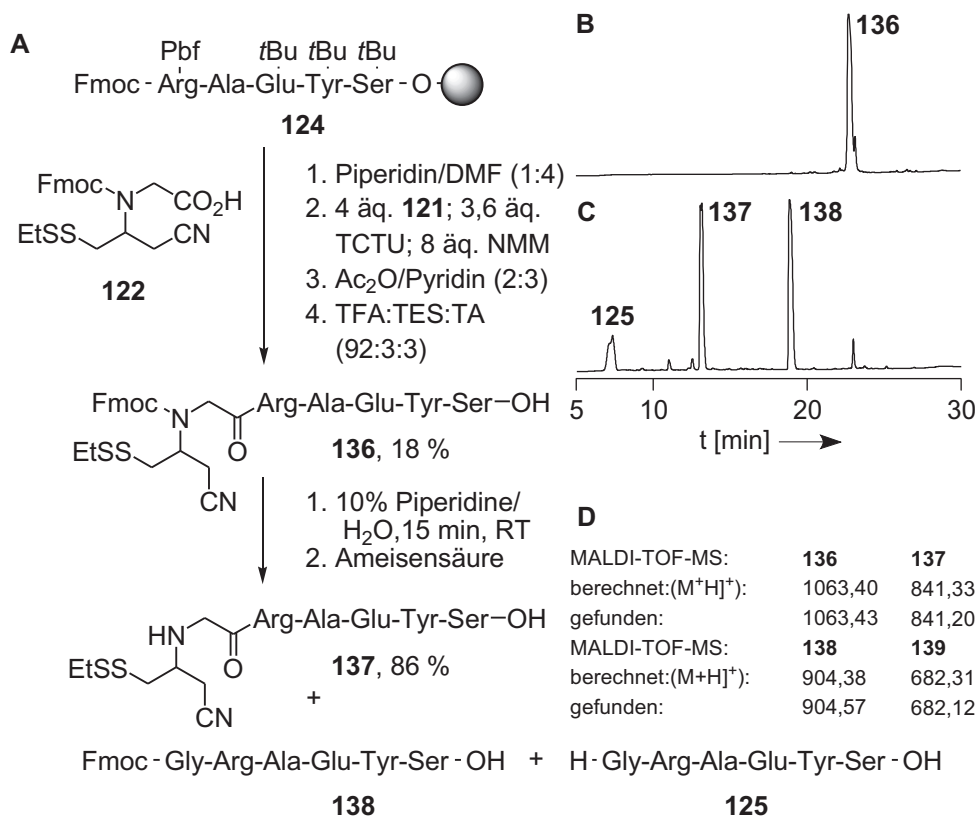


Abbildung 4.23: Synthese des unsymmetrischen Disulfids und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. **A:** Das als unsymmetrisches Disulfid blockierte Butyronitrilauxiliarpeptid **136** wurde *N*-terminal Fmoc-blockiert vom Trägerharz gespalten. Nach in Lösung durchgeführter Fmoc-Abspaltung konnte das Modellpeptid **137** isoliert werden. Als Nebenreaktion erfolgte auch die Abspaltung des Auxiliars (**138** und **139**). **B:** HPLC-Spur von A1 (vor Fmoc-Abspaltung). **C:** HPLC-Spur nach Fmoc-Abspaltung. (HPLC-Bedingungen: Grad. 3; $\lambda = 220$ nm). **D:** MALDI-TOF-MS-Daten der Peptide **136**, **137**, **138** und **125**. Die Ausbeuteangaben entsprechen der Menge an isoliertem Produkt.

aktionskomponente **140** erneut in dem Ligationspuffer gelöst. Bei der nach 15-minütiger Reaktionszeit durchgeführten HPLC-Analyse überschritt die Temperatur der Trennsäule (23 °C anstelle 55 °C) nicht die Inkubationstemperatur, um einer möglichen temperaturabhängigen Auxiliarabspaltung vorzubeugen. Auch auf säure-haltige Eluenten wurden verzichtet, um einer eventuell vorliegende Säurelabilität zu begegnen (Abb. 4.24).

Es wurde festgestellt, dass das Nitrilauxiliar unter den Bedingungen einer nativen chemischen Ligation nicht ausreichend stabil war. Die Abspaltung vollzog sich sobald Thiolfunktion und α -Aminogruppe am *N*-Terminus des Peptides frei von Schutzgruppen waren. Die Ablösung des nitril-substituierten Auxiliars konnte sehr leicht bewerkstelligt werden. Für den Einsatz in der cystein-freien Ligation

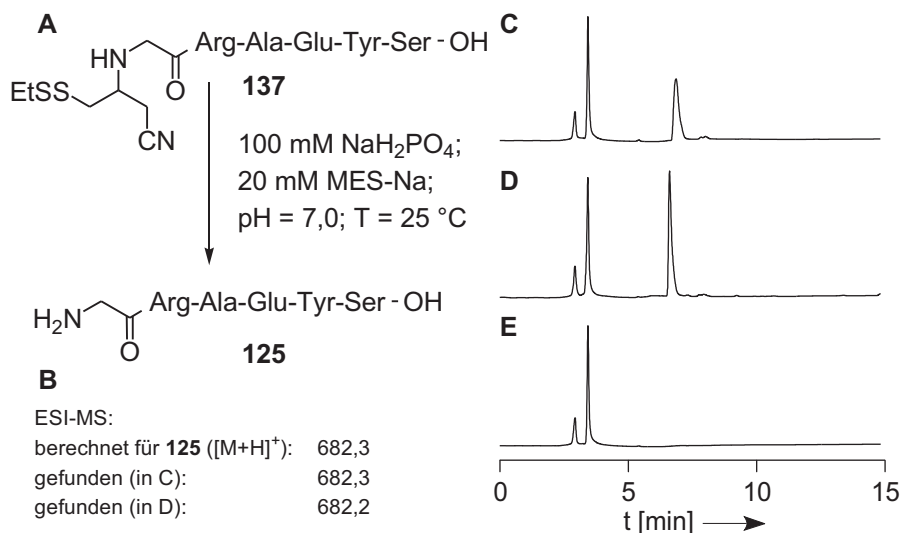


Abbildung 4.24: Labilität des Nitrilauxiliars unter Ligationsbedingungen. **A:** Unter reduktiven Bedingung unterliegt H-Nag(SET)-RAEYS-OH **137** unter Bildung von H-GRAEYS-OH **125** der sofortigen Abspaltung des Auxiliars. **B:** ESI-MS-Daten. **C:** HPLC-Spur der Reaktion nach 15 Minuten. **D:** HPLC-Spur des in Puffer gelösten Referenzpeptids H-GRAEYS-OH. **E:** Kontrolle: HPLC-Spur des Puffers. (Trennsäulentemperatur 23 °C, Gradient 3 % B auf 10 % B in 20 min; (A: H₂O; 1 % CH₃CN; B: CH₃CN; 1 % H₂O). Die Elution des Auxiliarpeptids **137** erfolgte bei dem angegebenen Gradienten nicht innerhalb der 20 Minuten, sondern erst im nachfolgenden Spülschritt.

musste jedoch die Elektronenakzeptorstärke der Gruppe reduziert werden.

Synthese eines Amidauxiliarpeptides

Das Nitrilauxiliarpeptid **137** war gegenüber den Bedingungen der nativen chemischen Ligation nicht stabil. Als eine Alternative schien das Peptid Fmoc-Aag-RAEYS-OH **134** geeignet, da auch das darin enthaltene Butyramidauxiliar die strukturellen Anforderungen für den Ablauf einer erweiterten nativen chemischen Ligation erfüllte. Fraglich war jedoch, ob aufgrund des geringen Elektronenzuges der primären Amidfunktion die Initiation der als Voraussetzung für die Ablösung vom Peptidrückgrat geltenden E1_{cb}-Eliminierung gelingen würde.

Zunächst musste die Fmoc-Schutzgruppe vom *N*-Terminus des Peptides **134** in Lösung entfernt werden, das im Gemisch mit dem Thiolactonpeptid **135** vorlag. Im **135** lag die Sulfanylfunktion durch die Cyclisierung zum Thiolacton blockiert vor. Da somit dessen Teilnahme an einer Ligation nicht möglich war, wurde zunächst versucht die beiden Peptide **134** und **135** chromatographisch voneinander zu separieren. Trotz eines vergleichsweise großen Retentionszeitunterschiedes

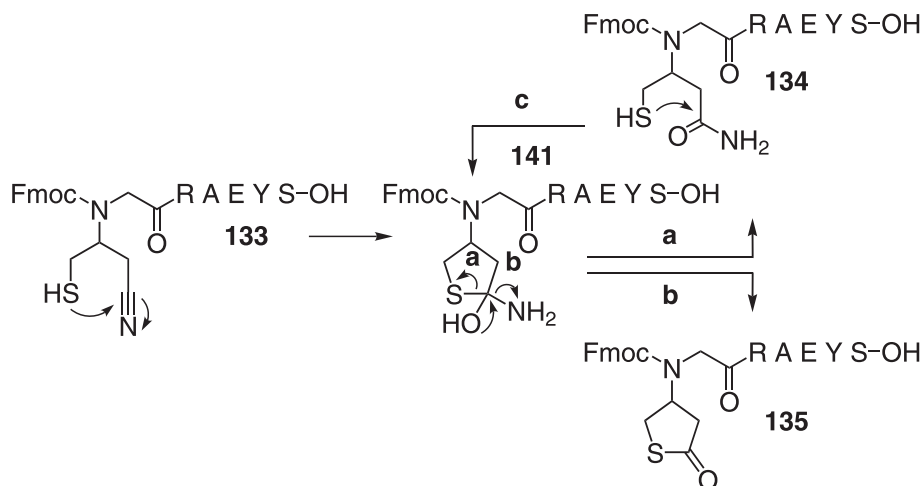


Abbildung 4.25: Vervollständigter angenommener Mechanismus der Thiolactonbildung. Zusätzlich zu den bereits in Abb. 4.21 beschriebenen Reaktionen erfolgte im Butyramidauxiliar des Peptides **134** der Angriff der Thiofunktion auf das benachbarte primäre Amid. Dadurch konnte das tetrahedrale Intermediat **141** als Vorläufer des Thiolactonpeptides **135** zurückgebildet werden.

(Abb. 4.22 C) war es nicht möglich, die Thiolactonspezies **135** vom gewünschten Fmoc-geschützte Butyramidauxiliarpeptid **134** zu trennen. H-Tag-RAEYS-OH **135** konnte hingegen problemlos in reiner Form isoliert werden. Das deutet daraufhin, dass **135** auch aus **134** gebildet werden kann (Pfad c und b in Abb. 4.25).

Es wurde angenommen, dass auch das deblockierte Peptid dieser Cyclisierungsreaktion unterliegen würde. Unter diesem Gesichtspunkt erschien es nicht sinnvoll die Fmoc-Schutzgruppe vom *N*-Terminus von Fmoc-Aag-RAEYS-OH **134** ohne vorherige Blockierung der nucleophilen Sulfanylfunktion in Lösung zu entfernen.

Daher wurde **134** in das symmetrische Disulfid **142** überführt. Hierfür wurde die Lösung der Peptide **134** und **135** einem Druckluftstrom ausgesetzt. Durch die Zugabe von Ammoniak zu der Reaktionslösung konnte auch das Thiolactonpeptid **135** in das Disulfid **142** umgewandelt werden (Abb. 4.26 A). Dabei wurde das Butyramidpeptid **134** wiederhergestellt, da die Thioesterbindung in **135** der Ammoniolyse nicht stand hielt. Die Fmoc-Schutzgruppe blieb hingegen unter diesen Bedingungen intakt. Nach vollständiger Umsetzung konnte durch eine 20-minütige Behandlung mit einer 10%igen Piperidinlösung das Fmoc-deblockierte symmetrische Disulfid **143** als Startmaterial für die cystein-freie native chemische Ligation erhalten werden. Bei einer Verkürzung der Reaktionszeit erfolgte teilweise nur eine unvollständige Fmoc-Abspaltung.

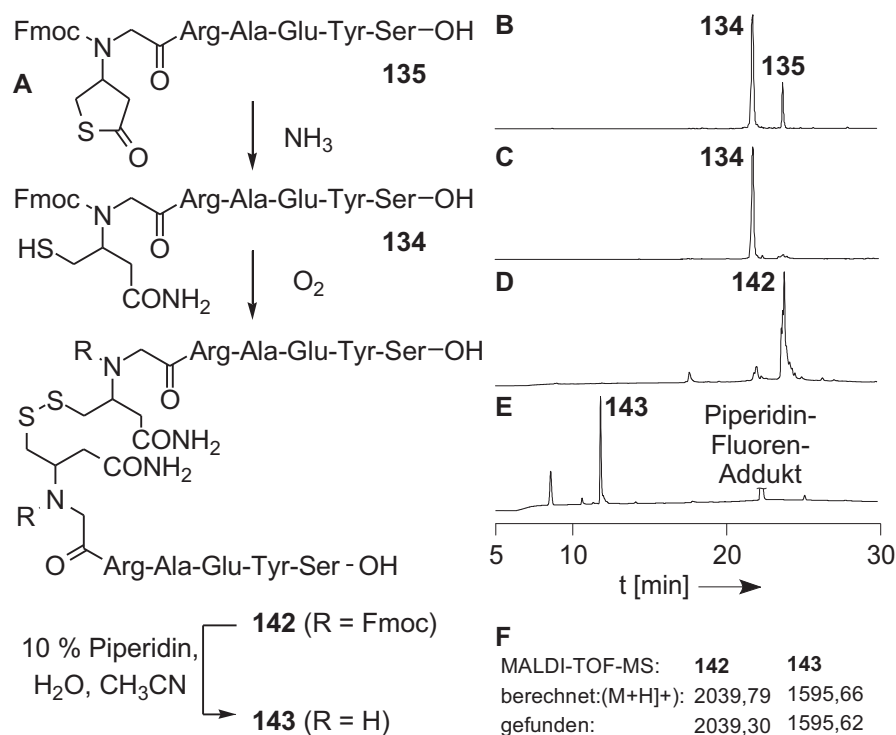


Abbildung 4.26: Synthese eines symmetrischen Disulfides. **A:** Das acyclische Butyramidauxiliarpeptid **134** wurde unter dem Einfluss von Luftsauerstoff zum Disulfid **142** oxidiert. Hierbei war es durch Zugabe von Ammoniak möglich, auch das Thiolactonpeptid **135** umzusetzen. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe konnte das Disulfid **143** als Startmaterial für die cystein-freie Ligation zugänglich gemacht werden. **B:** Gemisch von Butyramid- und Thiolactonpeptid **134** und **135**. **C:** HPLC des Gemisches von **134** und **135** nach 10minütiger Aminolyse. **D:** HPLC nach Überführung in das symmetrische Disulfid **142** (Rohprodukt). **E:** HPLC nach Fmoc-Abspaltung (HPLC-Bedingungen: Gradient 3; $\lambda = 220 \text{ nm}$). **F:** MALDI-TOF-MS-Daten von **142** und **143**.

4.1.5 Cystein-freie Peptidfragmentverknüpfung

Vor der Untersuchung der Ligationseigenschaften des Butyramidauxiliars wurde dessen Stabilität unter Ligationsbedingungen evaluiert. Dazu wurde das Disulfid **143** in einem Ligationspuffer (100 mM NaH₂PO₄, pH = 7,0) unter reduzierenden Bedingungen (20 mM Natrium-2-mercaptoethansulfonat) gelöst und die Reaktion mittels HPLC bewertet (Abb. 4.27 A). Gleichzeitig wurde die Umthioesterung von H-LYKAG-SPAA **140** unter den gleichen Bedingungen untersucht (Abb. 4.27 B). Nach 30-minütiger Reaktionszeit war das Disulfid **143** vollständig reaktiv ge-

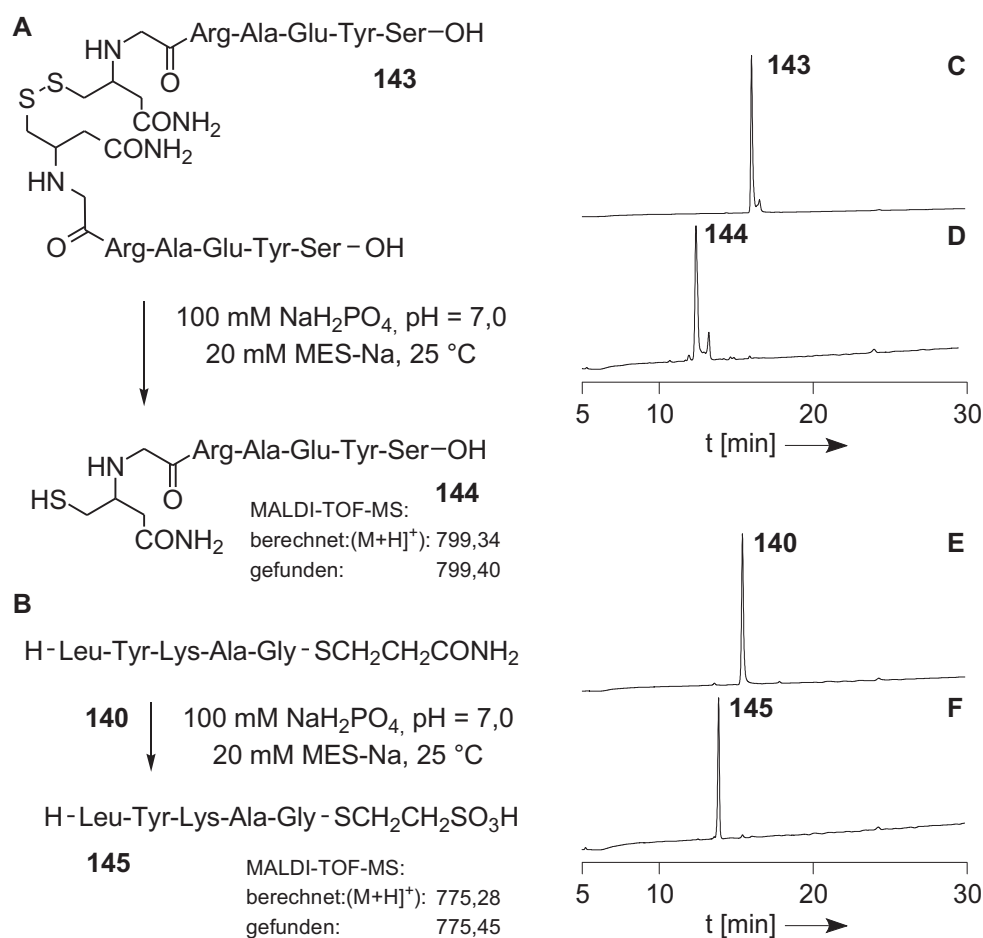


Abbildung 4.27: Stabilität des Butyramidauxiliars und Thiol-Thioester-Gleichgewicht. **A:** Das Disulfid **143** wurde durch Reduktion mit Natrium-Mercaptoethansulfonat in das Butyramidauxiliarpeptid **144** überführt. Die Bildung des auxiliar-freien Peptides H-GRAEYS-OH **125** wurde nicht beobachtet. **B:** Thiol-Thioester-Gleichgewicht von H-LYKAG-SR **140** / **145**. **C:** HPLC von **143**. **D:** HPLC nach Reduktion von **143**. **E:** HPLC von H-LYKAG-SPAA **140**. **F:** HPLC von **140** nach Thiolaustausch (HPLC-Bedingungen: Grad. 1; λ = 220 nm).

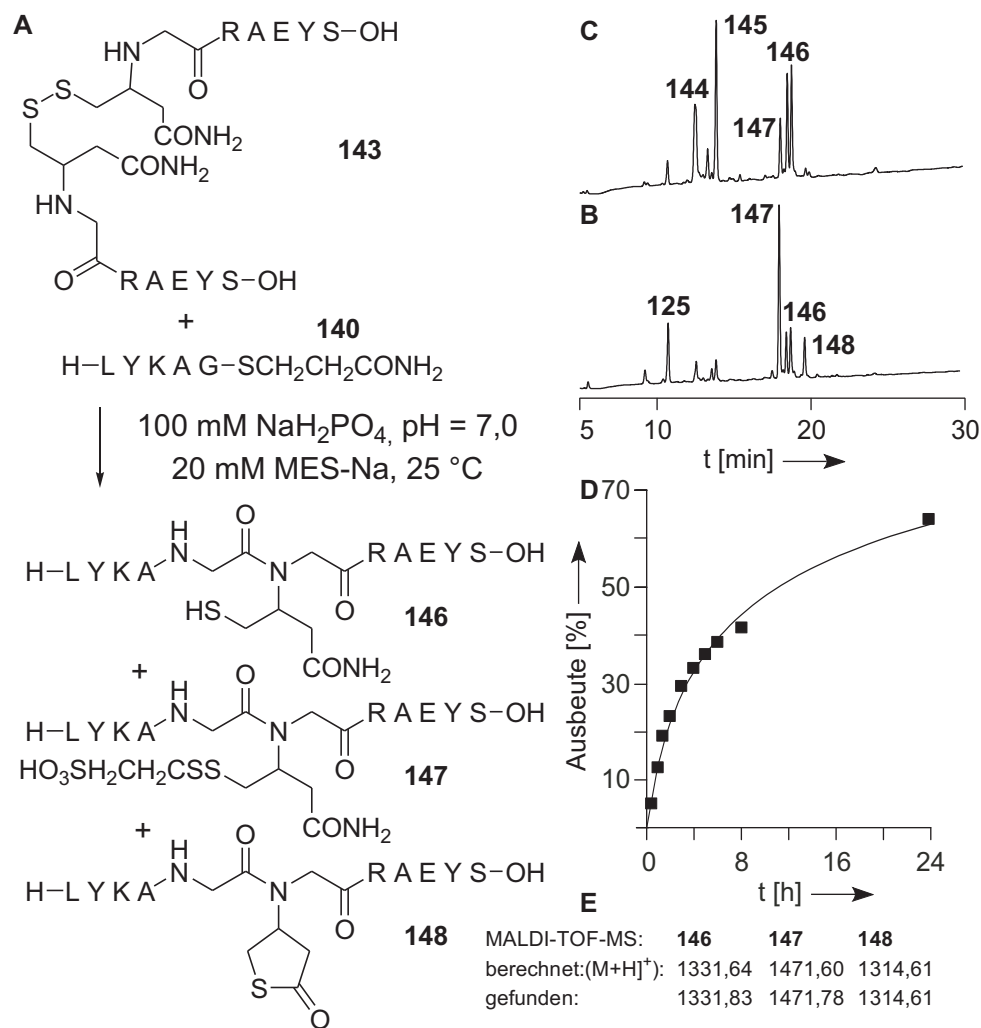


Abbildung 4.28: Cystein-freie, auxiliar-vermittelte Ligation. **A:** In der Modellligation wurde das Disulfid **143** mit dem Peptidthioester **140** umgesetzt. Als primäres Produkt entstand das acyclische Butyramid **146**, aus welchem durch Oxidation das Disulfid **147** oder durch eine Cyclisierungsreaktion das Thiolacton **148** hervorging. Das reduzierte Butyramidstartmaterial **144** unterlag in einer Nebenreaktion der unerwünschten Abspaltung des Auxiliars, wobei das Peptid **125** gebildet wurde. **B:** MALDI-TOF-MS-Daten der Ligrationsprodukte **146**, **147** und **148**. **C:** Ligation nach 2 Stunden. **D:** Ligation nach 19 Stunden. (HPLC-Bedingungen: Gradient 1; $\lambda = 220$ nm). **E:** Reaktionskinetik.

spalten. Das auxiliar-freie Peptid H-GRAEYS-OH **125** wurde nicht nachgewiesen. Das Thiol-Thioestergleichgewicht lag zu diesem Zeitpunkt vollständig auf Seiten des 2-Mercaptoethansulfonatthioesters **145**.

Bei der Verknüpfung der Peptidfragmente **144** und **145** wurde als Primärprodukt das gewünschte Peptid **146** gebildet, das im Chromatogramm als Doppelpeak

erschien. Der Grund hierfür war, dass die Monomersynthese (vgl. Abschnitt 4.1.3) nicht unter Berücksichtigung einer einheitlichen Stereochemie durchgeführt wurde. Ein paralleles Vorliegen von Ligationsprodukt **146** und nicht-umgelagertem Intermediat konnte durch die Behandlung mit Piperidin ausgeschlossen werden. Die Thioesterstruktur dieser vor dem $S \rightarrow N$ -Acyltransfer vorliegenden Zwischenstufe hätte der Behandlung nicht standhalten können.

Nach zweistündiger Reaktion wurde des weiteren die Bildung des unerwünschten Auxiliarspaltproduktes H-GRAEYS-OH **125** beobachtet. Obwohl diese Nebenreaktion zuvor nicht auftrat (vgl. Abbildung 4.27 A/D), war **125** nach 19 Stunden zu 13 % entstanden.

Das Ligationsprodukt **146** unterlag ebenfalls Folge- bzw. Nebenreaktionen. Zur Spaltung des symmetrischen Disulfides **143** wurde das Thioladditiv Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz zugegeben. Weitere reduzierende Reagenzien wurden nicht eingesetzt und die Ligation somit unter schwach reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Aufgrund dessen entstand als Hauptprodukt der Reaktion das unsymmetrische Disulfid **147**, welches aber durch Reduktion mit Triscarboxyethylenphosphan in das primäre Ligationsprodukt **146** umgewandelt werden konnte. Als eine weitere Folgereaktion trat die Cyclisierung des Butyramides ein, die auch bereits während der Synthese des Peptides beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 4.1.4 und 4.1.4). Die Bildung dieses Folgeproduktes unterlag dem in Abbildung 4.25 gezeigten Reaktionsmechanismus. Wie aus dem Kinetik-Diagramm (Abb. 4.28 E) ersichtlich wird, erfolgte nach 24 Stunden Reaktionszeit die Bildung der Ligationsprodukte **146**, **147** und **148** in etwa 65 % Ausbeute.

4.1.6 Abspaltung des Auxiliars

Die Voraussetzung für die basen-induzierte Ablösung des Auxiliars wird durch einen hinreichend starken Elektronenakzeptorsubstituenten geschaffen. Die Deprotonierung der α -ständigen Methylenposition initiiert eine Eliminierung nach dem $E1_{cb}$ -Mechanismus, bei der das Zielpeptides als Fluchtgruppe freigesetzt wird (vgl.

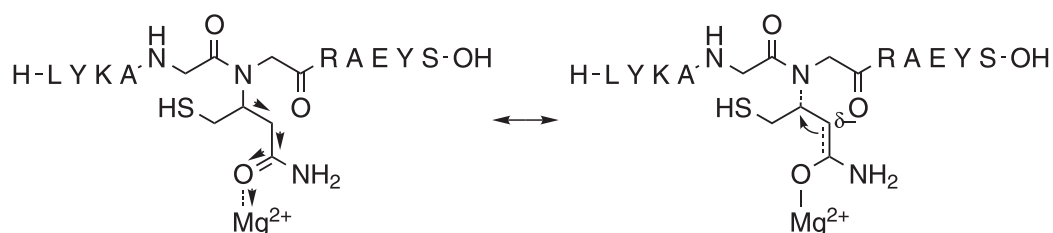


Abbildung 4.29: Postulierter Einfluss von Lewis-Säuren auf die Auxiliarabspaltung. Magnesiumkationen besetzen reversibel elektronenreiche Positionen innerhalb des Peptides. Die Akzeptoreigenschaften beeinflussen die Elektronendichteverteilung innerhalb des Peptides, wodurch die Deprotonierung vereinfacht und die Fluchtgruppeneigenschaften des Peptides verstärkt werden.

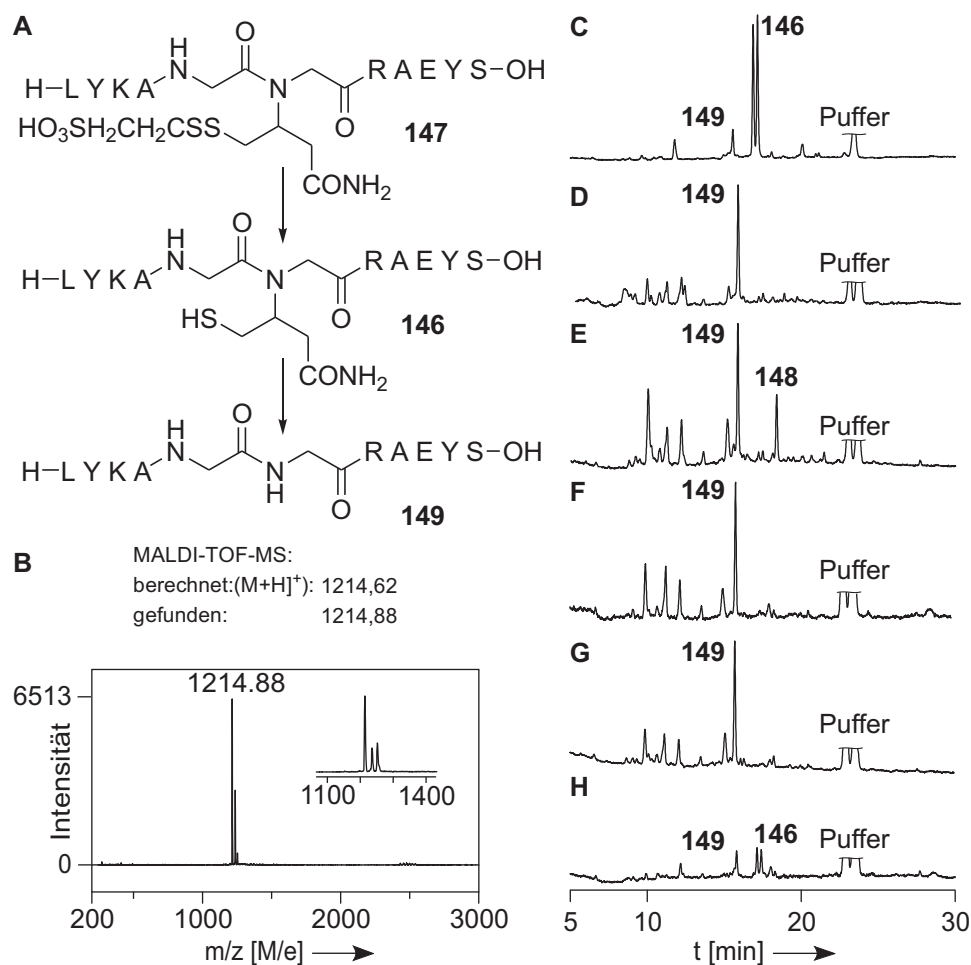


Abbildung 4.30: Abspaltung des Auxiliars - Einfluss von Magnesiumionen. **A:** Vor Abspaltung des Auxiliars wird zunächst die Disulfidbindung in **147** gelöst. **B:** MALDI-TOF-MS-Daten des Produktes **149**. Reaktionsbeding.: **C:** 200 mM $MgCl_2$, 10 mM TCEP, pH = 9,6, 25 °C, 24h; **D:** 200 mM $MgCl_2$, 10 mM TCEP, pH = 9,6, 50 °C, 24h; **E:** 10 mM $MgCl_2$, pH = 7,5, 50 °C, 24h; **F:** 10 mM $MgCl_2$, pH = 9,5, 50 °C, 24h; **G:** pH = 9,5, 50 °C, 24h; **H:** pH = 12, 50 °C, 24h; **E - H:** 10 mM TCEP, 100 mM NaH_2PO_4 (HPLC-Beding.: Grad. 2; λ = 220 nm).

Abb. 4.1).

Bei der Synthese des Modellpeptides hatte sich jedoch nur das Butyramidaxiliar mit einem vergleichsweise schwachen Elektronenakzeptorsubstituenten als stabil genug erwiesen. Für die Deprotonierung dieses Auxiliars wurde zunächst die relativ starke Base Piperidin untersucht. Das Ligationsprodukt **146** wurde sowohl unreduziert und als auch nach Reduktion mit Triscarboxyethylenphosphan einer einstündigen Behandlung mit einer 50%igen Piperidinlösung bei Raumtemperatur unterworfen. Hierbei zeigten weder das Disulfid **147** noch das reduzierte

primäre Ligationsprodukt **146** die nötige Reaktivität und es konnte keinerlei Abspaltung beobachtet werden.

Anschließend wurde die Wirksamkeit wässriger Puffersysteme evaluiert. Für die ersten Experimente wurde ein auf den pH-Wert 12,0 eingestellter Phosphatpuffer (100 mM NaH_2PO_4) verwendet, der zur Aufrechterhaltung reduktiver Bedingungen Triscarboxyethylenphosphan (25 mM) enthielt. Das unsymmetrische Disulfid **147** wurde darin für eine Dauer von 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit konnte das Zielpeptid **149** nur in Spuren neben dem unreaktierten reduzierten Startmaterial detektiert werden.

Daraufhin wurde untersucht, ob eine Beschleunigung der Auxiliarabspaltung durch die Zugabe von Lewis-Säuren möglich war. Die dazu durchgeführten Experimente basierten auf der Hypothese, dass Kationen wie etwa Mg^{2+} an elektronenreiche Positionen des Peptides koordinieren können. Derartige Wechselwirkungen würden den Elektronenzug und damit die Acidität des α -Protons erhöhen (Abbildung 4.29). Viele für diesen Lösungsansatz als Lewis-Säuren in Frage kommenden Metallionen bilden im basisch wässrigen Milieu schwer lösliche Hydroxide. Bei Verwendung von MgCl_2 in hohen Konzentrationen (200 mM) konnte der pH-Wert der Lösung bis auf pH = 9,6 eingestellt werden, ohne dass sich schwerlösliches $\text{Mg}(\text{OH})_2$ bildete. Aus diesem Grund wurde auch keine Puffersubstanz wie etwa Natriumdihydrogenphosphat zugesetzt. Zur Aufrechterhaltung reduktiver Bedingungen enthielt die Reaktionslösung jedoch zusätzlich Triscarboxyethylenphosphan (10 mM). Durch die Anwendung dieser Bedingungen konnte die Freisetzung des auxiliar-freien Modellpeptides **149** induziert werden. Zunächst wurde das Experiment bei Raumtemperatur und über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Hierbei bildete sich das Produkt nur in geringem Maß (Abb. 4.30 C). Erst die Erhöhung der Temperatur auf 50 °C bewirkte eine vollständige Umsetzung von **147** (Abb. 4.30 D). Neben dem Zielpeptid **149** entstand auch eine größere Anzahl an Nebenprodukten, die jedoch massenspektrometrisch nicht identifiziert werden konnten.

Unter gepufferten Bedingungen (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM MgCl_2) erfolgte bei pH = 7,5 und 9,5 ebenfalls eine vollständige Umsetzung, wobei bei dem niedrigeren pH-Wert auch das Thiolacton **148** gebildet wurde (Abb. 4.30 E / F).

Durch eine Negativkontrolle (pH = 9,5; T = 50 °C; kein MgCl_2) sollte die katalysierende Wirkung der Magnesiumionen nachgewiesen werden. Das Chromatogramm der Reaktion (Abb. 4.30 G) zeigte aber nur geringe Unterschiede zu den HPLC-Spuren der Reaktionen mit MgCl_2 (Abb. 4.30 D und F) mit ähnlichem pH-Wert. Eine Lewis-Säure-Katalyse der Abspaltung lag somit doch nicht vor.

Das Kontrollexperiment wurde bei pH = 12,0 wiederholt. Es konnte hierbei keine Verbesserung erzielt werden, da nur eine unvollständige Umsetzung des Startmaterials erfolgte (Abb. 4.30 H). Durch die Wiederholung des Experimentes bei diesem hohen pH-Wert konnte aber neben der Temperaturabhängigkeit auch ein pH-Optimum identifiziert werden. Ein Vergleich der HPLC-Spuren der Reaktionen bei pH = 7,5; 9,5 bzw. 12,0 (Abb. 4.30 E; G bzw. H) zeigte, dass die Umsetzung bei pH = 9,5 am besten verlaufen war.

4.1 Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

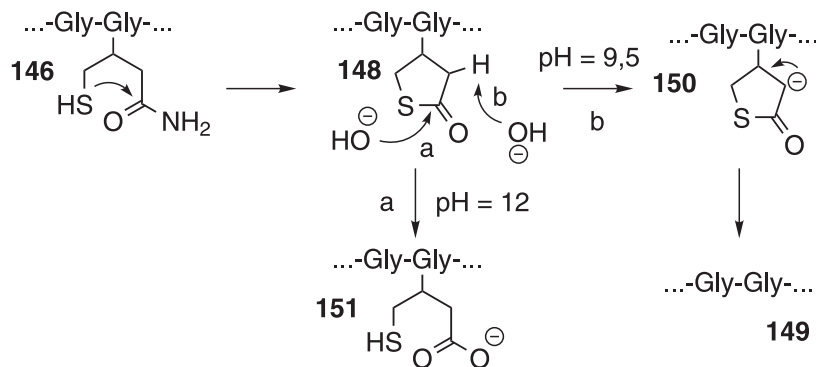


Abbildung 4.31: Mechanismus der Abspaltung des Auxiliars. Die Struktur **151** ist hypothetisch und wurde nicht nachgewiesen.

Die in Abbildung 4.1 dargestellte $E1_{cb}$ -Eliminierung profitiert sowohl von einer Temperaturerhöhung als auch von einer Anhebung des pH-Wertes. Die Beobachtung, dass die Abspaltung des Auxiliars bei pH = 9,5 besser verlief als bei pH = 12, erscheint unter diesem Gesichtspunkt auf den ersten Blick unlogisch. Eine Erklärung für den Befund dieser pH-Abhängigkeit wird in Abbildung 4.31 aufgezeigt. Es könnte demnach zunächst die bereits beschriebene Bildung eines Thiolactons erfolgen. Die Abstraktion eines Protons, das α -ständig zu einem Thioester steht ist einfacher zu bewerkstelligen als die α -H-Abstraktion bei einem Amid, da in letzterem Fall die Amidprotonen als konkurrierende Säure fungieren.

Dieser Verlauf war jedoch nur bei dem niedrigeren pH-Wert (pH = 9,5) möglich, da die Thioesterstruktur höheren pH-Werten nicht standhielt. Ihre Hydrolyse würde zu dem offenkettigen Carboxylat in **151** führen, das eine erheblich geringere C,H-Acidität aufweisen sollte. Der Nachweis der Struktur **151** gelang nicht, da unter den sauren Bedingungen der HPLC-Analyse das Thiolacton zurückgebildet wurde.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Abspaltung in weiteren Experimenten ausgehend vom unsymmetrischen Mercaptobutyramidisulfid **147** und vom Thiolactonpeptid **148** untersucht. Die Peptide wurden in einem NaOH/Glycin-Puffer (100 mM) (pH = 9,5 und 12,0) in Gegenwart von Triscarboxyethylenphosphan (25 mM) gelöst und über Nacht bei 50 °C inkubiert. In beiden Fällen erfolgte bei pH = 9,5 die Ablösung des Auxiliars, die aber bei dem Disulfid **147** durch die Bildung von deutlich mehr Nebenprodukten begleitet wurde (Abb. 4.32 A). Die Erhöhung des pH-Wertes führte dazu, dass in beiden Fällen die Bildung des Zielpeptides **149** nicht mehr möglich war (Abb. 4.32 C/D).

Das beste Ergebnis wurde durch die direkte Umsetzung des Thiolactons **148** bei pH = 9,5 erzielt, wohingegen bei pH = 12,0 dessen vollständige Zersetzung eintrat. Die Anwendung nicht-reduzierender Bedingungen (Puffer ohne Triscarboxyethylenphosphan, pH = 9,5) für die Abspaltung des als unsymmetrisches Disulfid vorliegenden Butyramidauxiliars vom Rückgrat des Peptides **147** war indes nicht erfolgreich, da das Startmaterial nach Ablauf der Reaktionszeit unverändert

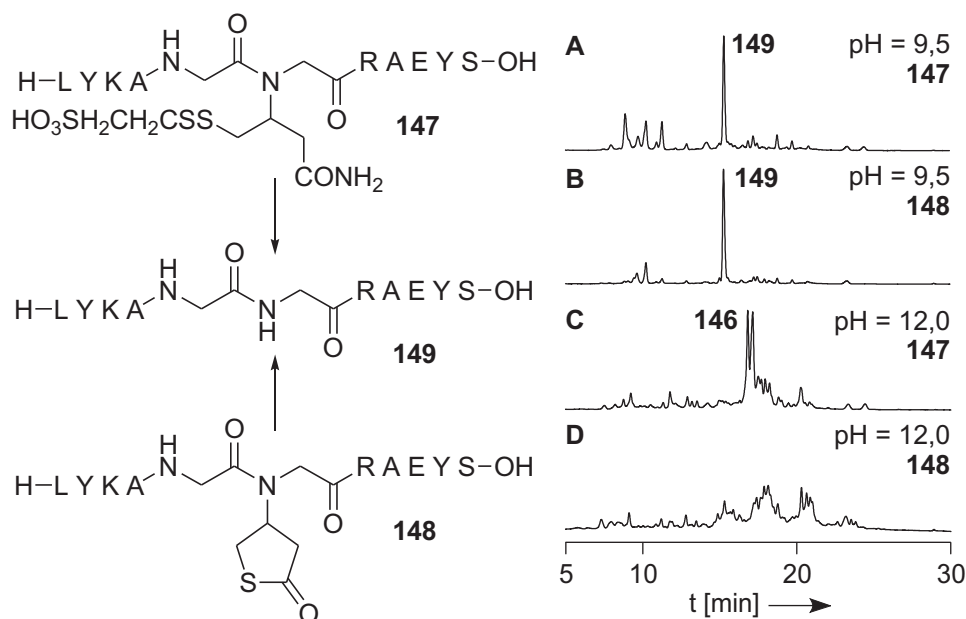


Abbildung 4.32: Auxiliärlösung - Vergleich Disulfid **147** und Thiolacton **148**. Von beiden Peptiden konnte bei pH = 9,5 das Auxiliar entfernt werden. Im Fall von **148** wurden weniger Nebenprodukte gebildet. Nach der Behandlung bei höherem pH konnte das Peptid **149** nicht detektiert werden. Reaktionsbeding.: 100 mM Glycin/NaOH, 25 mM TCEP, 50 °C; HPLC-Spuren **A**: Reakt. von **147** (pH = 9,5); **B**: Reakt. von **148** (pH = 9,5); **C**: Reakt. von **147** (pH = 12,0); **D**: Reakt. von **148** (pH = 12,0). (HPLC-Beding.: Gradient 2; λ = 220 nm).

vorlag.

Durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 80 °C konnten die Ergebnisse der Reaktion weiter verbessert werden, wobei gleichzeitig die Verkürzung der Reaktionsdauer möglich war. Die hierbei erzielten Ergebnisse waren zudem im Einklang mit den im vorher getroffenen Aussagen. Bei der Reaktion des Thiolactons **148** erfolgte eine fast vollständige Umsetzung bereits nach 30-minütiger Reaktion mit einer Ausbeute von 71 % (Abb. 4.33 **B**). Im gleichen Zeitraum waren durch die Reaktion des acyclische Butyramidderivates **147** lediglich 19 % des Zielpeptides **149** entstanden (Abb. 4.33 **E**). Durch die Reduktion des Disulfides lagen die beiden Diastereomere von **146** vor und es konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls das Thiolacton **148** in geringen Menge detektiert werden. Erst nach Ablauf von 2,5 Stunden war die Umsetzung vollständig wobei lediglich 51 % Ausbeute (vgl. Abb. 4.32 **A**: 50 °C, 39 %) erzielt wurden.

4.1.7 Zusammenfassung

Die Synthese eines Aminosäurebausteines für die erweiterte native chemische Ligation gelang auf Basis eines Nitril auxiliars durch die Michael-Addition von Glycin

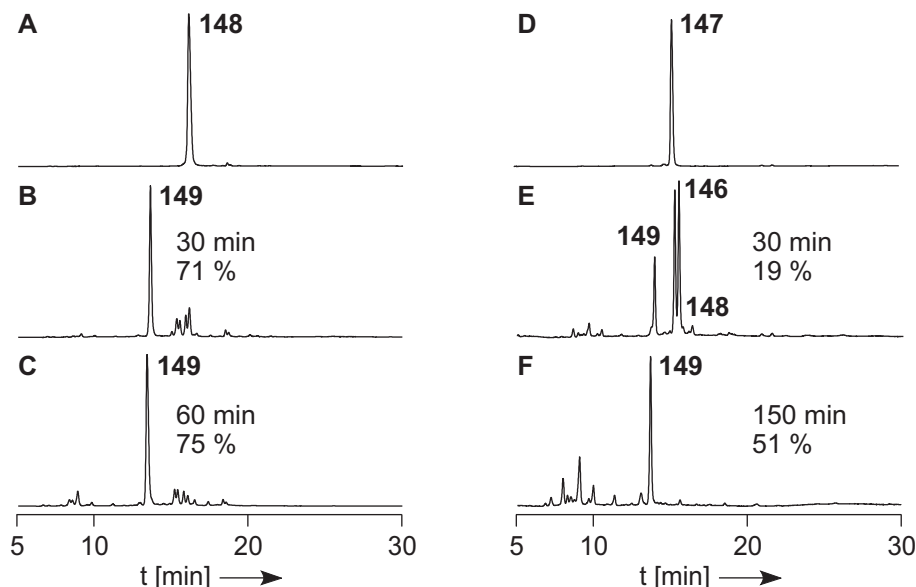


Abbildung 4.33: Optimierte Auxiliarabspaltung. Reaktionsbedingungen: 0,5 mM Peptid, 100 mM Glycin, 100 mM NaOH, 25 mM TCEP, $T = 80^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 9,5$. HPLC-Spuren **A**: Thiolacton **148** (Startmaterial); **B**: Abspaltung nach 30 min; **C**: Abspaltung nach 60 min; **D**: Disulfid **147** (Startmaterial); **E**: Abspaltung nach 30 min (die Reduktion des Disulfides erfolgte und es erschienen beide Diastereomere von **146**; zusätzlich wurde in Spuren das Thiolacton **148** gefunden); **F**: Abspaltung nach 150 min. (HPLC-Beding.: Gradient 2; $\lambda = 220\text{ nm}$).

und eines geschützten Mercaptobutennitrils. Der dabei hergestellte Festphasensynthesebaustein wurde für die Synthese eines Modellpeptides verwendet. Es zeigte sich jedoch insbesondere bei der Aufreinigung dieses Peptides, dass das Nitirilauxiliar chemisch nicht stabil war. Die deblockierte Thiofunktion konnte die benachbarte Nitrilfunktion nucleophil angreifen, wobei diese in eine primäre Amidfunktion konvertiert wurde. Zudem musste festgestellt werden, dass das Nitrilauxiliar unter den Bedingungen der nativen chemischen Ligation sofort vom Peptid abgespalten wurde. Die Peptidfragmentverknüpfung wurde aufgrund dessen anhand des Butyramidderivates untersucht. Die Ligation konnte mit einer ansprechenden Kinetik durchgeführt werden und nach 24 Stunden Reaktionszeit waren 65 % des Verknüpfungsproduktes entstanden. Hierbei ist Raum für Optimierungen vorhanden, wobei z. B. durch eine Veränderung der Ligationsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Thioladditive) Verbesserungen erzielt werden können. Auch die gezielte Abspaltung des Auxiliars nach der Ligation durch die Initiation einer E1_{cb} -Eliminierung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings erfolgte nicht die direkte Abspaltung des in der Ligation zum Einsatz kommenden Butyramidauxiliars, sondern die eines Thiolactons mit höheren $\alpha\text{-C,H}$ -Aciditätseigenschaften. Dieses Derivat wurde gebildet, wenn die Thiofunktion des Butyramidvorläufers die benachbarte primäre Amidfunktion nucleophil angriff und dabei eine Cyclisie-

ung herbeiführte. Erst nach der Umwandlung des Amidauxiliars in den cyclische Thioester konnte die Ablösung durch Inkubation bei pH = 9 erfolgen. Die Cyclisierung erfolgte auch unter den Abspaltbedingungen, wenn das acyclische Butyramid der Reaktion unterworfen wurden. Eine erheblich bessere Ausbeute bei gleichzeitiger Verkürzung der Reaktionszeit konnte erzielt werden, wenn das vorgebildete Thiolacton der Abspaltung unterzogen wurde.

4.2 Native chemische Verknüpfung mit Valin

4.2.1 Einleitung und Konzept

Die Ligations-Entschwefelungs-Strategie bietet weitere Möglichkeiten, Peptidfragmente die über kein geeignetes Cystein verfügen, miteinander zu verknüpfen (Abschnitt 2.10).[144, 114, 141, 18, 38, 56, 34] Die Entschwefelung der hierbei verwendeten β -Mercapto- α -amino-säure erfolgte nach der Ligation durch Anwendung metall-basierter [144] oder metall-freier Methoden.[141]

Für die native chemische Verknüpfung mit Valin wurde dessen kommerziell verfügbares β -Mercaptoderivat Penicillamin verwendet. (Abb. 4.34). Analog der cystein-basierten Ligation vollziehen sich der Thiolaustausch (**a** in Abb. 4.34) und

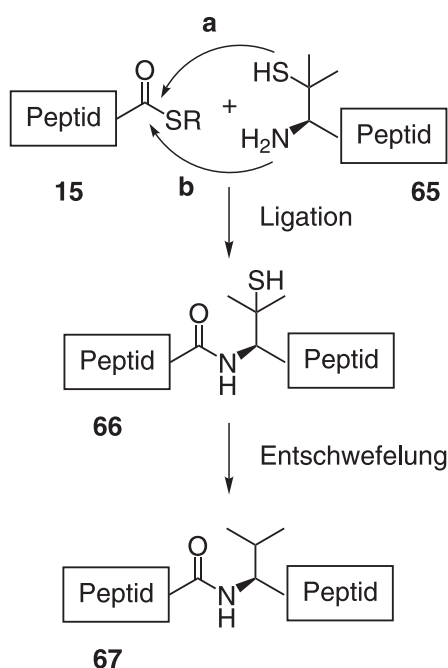


Abbildung 4.34: Native chemische Verknüpfung mit Valin. Das Penicillaminylopeptid **65** reagiert mit dem Peptidthioester **15** durch reversiblen Thiolaustausch und anschließenden $S \rightarrow N$ -Acyltransferschritt. Danach wird das überzählige Schwefelatom entfernt und die Valin-Verknüpfung bereitgestellt.

die anschließende Verschiebung des Acylrestes (**b** in Abb. 4.34). Nach der Fragmentverknüpfung wird der Penicillaminrest durch die Entfernung des überzähligen Schwefelatoms in einen Valinrest überführt.

In Abschnitt 4.2.2 wird das Potential der Ligation zunächst am Beispiel eines sterisch anspruchlosen Glycinthioesters demonstriert und optimiert.

Die konsequente Weiterentwicklung der Strategie im Rahmen der Arbeiten zu dieser Promotion führte zu Bedingungen, die auch die Verknüpfung sterisch anspruchsvoller *C*-Termini ermöglichte (Abschnitt 4.2.3).

Während durch die metall-katalysierte Entschwefelung der Ligationsprodukte lediglich befriedigende Ergebnisse erzielt werden konnten (Abschnitt 4.2.4), ermöglichte die Anwendung der metall-freien Bedingungen nach deren Optimierung gute bis sehr gute Ausbeuten (Abschnitt 4.2.5).

4.2.2 Penicillaminligation mit Glycinthioestern

Penicillamin ist ein β,β -Dimethylderivat von Cystein. Die sterische Hinderung der tertiären Thiolfunktion wurde zu Beginn des Projektes als ein großes Hindernis für Fragmentverknüpfungsreaktionen angesehen. Es erfolgten daher zunächst nur Ligationsexperimente mit einem ungehinderten Glycinthioester. Als erster wurde die Reaktion zwischen dem Penicillaminylopeptid H-PenRAEYS-NH₂ **152** und H-LYKAG-SPAA **140** in einem wässrigen Phosphatpuffersystem mit Natrium-Mercaptoethansulfonat als Thioladditiv untersucht (Abb. 4.35 **A**). Hierbei konnte nach 24 Stunden lediglich eine moderate Ligationsausbeute von 41 % erzielt werden. Die Ursachen lagen in der geringe Reaktivität des Thioesters und der Bildung eines unreaktiven, symmetrischen Disulfides (**c** in Abb. 4.35 **A**) des Penicillaminpeptides **152**. Im nachfolgenden Experiment, in dem die Evaluierung von Thiophenol und Benzylmercaptan als Thioladditiva erfolgte, wurde die Disulfidbildung durch Zugabe von TCEP unterbunden. Die erzielte Ausbeutesteigerung war jedoch gering und konnte auf die leichte Erhöhung des pH-Wertes von pH = 7,0 auf 7,5 zurückgeführt werden (Abb. 4.35 **B**). Erst durch Verzicht auf den Zusatz aliphatischer Thioladditive konnte eine erhebliche Steigerung der Reaktionsrate erreicht werden. Bei der Verwendung des Lösungsmittelgemisches aus wässrigem HEPES-Puffer mit NMP wurde nur Thiophenol als Beschleunigungszusatz zugesetzt, was zu einer 1,4- bis 2-fachen Steigerung der Reaktionsrate führte (Abb. 4.35 **C**). Das beste Ergebnis wurde durch die Verwendung eines wässrigen Phosphatpuffers (100 mM NaH₂PO₄) mit Thiophenol als alleinigem Additiv erzielt. Hierbei waren bereits nach zwei Stunden 41 % des Ligationsproduktes **154** detektierbar und die Gesamtausbeute konnte auf über 80 % (nach 48 Stunden) gesteigert werden (Abb. 4.35 **D**).

Aus dem Vergleich der untersuchten Reaktionsbedingungen konnte eine höhere Reaktivität des Phenylthioesters gegenüber Peptidthioestern mit aliphatischer Thiolkomponenten (Benzylmercaptan bzw. Mercaptoethansulfonsäure) geschlossen werden [40]. In Abbildung 4.35 sind die Chromatogramme der Reaktionen nach je zwei Stunden gezeigt. Trotz der Zugabe des reduzierenden Triscarboxy-

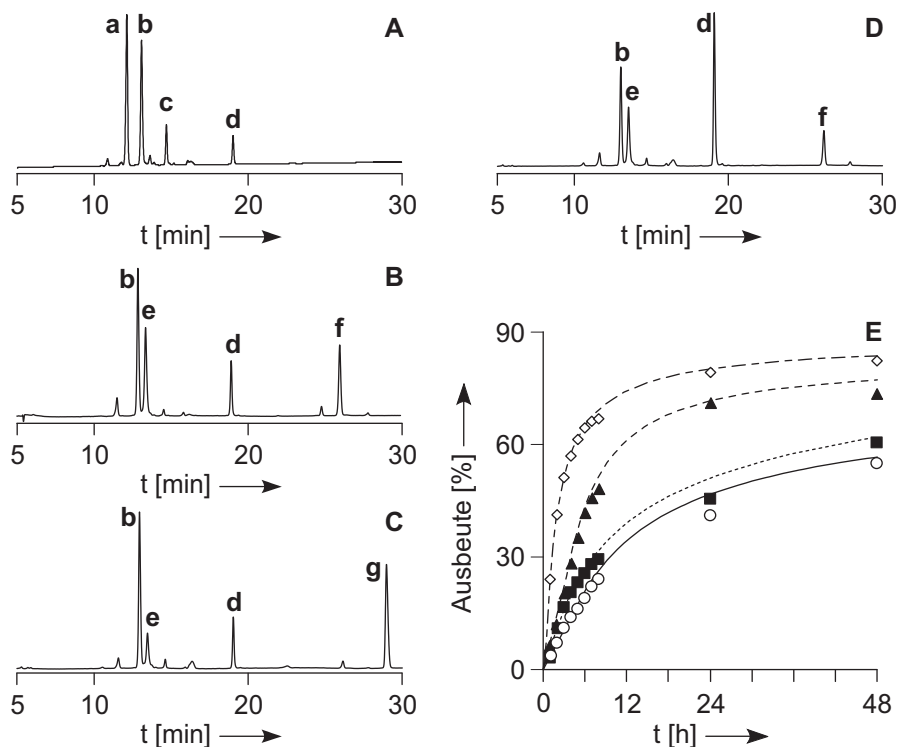


Abbildung 4.35: Evaluierung von Thioladditiven und Puffersystemen für die Ligation mit Penicillamin. Die gezeigten HPLC-Spuren geben die Zusammensetzungen der Reaktionsgemische nach zwei Stunden wieder. Bedingungen: **A:** 60 mM NaH_2PO_4 , pH = 7.0, 25 °C, 8 mM MES-Na, (—○—); **B:** 6 M GdmHCl; 100 mM NaH_2PO_4 , pH = 7.5, 50 mM TCEP, 3 Vol-% BnSH, 1 Vol-% PhSH, (—■—); **C:** 1 M HEPES, 6 M GdmHCl in H_2O , NMP (1:4), 5 Vol-% PhSH, (—▲—); **D:** 6 M GdmHCl; 100 mM NaH_2PO_4 , pH = 7.5, 50 mM TCEP, 1 Vol-% PhSH, (—◇—); **E:** Kinetiken der Ligationen unter den Bedingungen **A** (—○—), **B** (—■—), **C** (—▲—) bzw. **D** (—◇—); **a:** Mercaptoethansulfonsäurethioester: H-LYKAG-SMESA **145**; **b:** H-PenRAEYS- NH_2 **152**; **c:** sym. Disulfid von **152** (**153**); **d:** H-LYKAGPenRAEYS- NH_2 **154**; **e:** Mercaptopropionsäureamidthioester H-LYKAG-SPAA **140**; **f:** Benzylthioester H-LYKAG-SBn **155**; **g:** Phenylthioester: H-LYKAG-SPh **156**; (HPLC-Beding.: Grad. 1; λ = 280 nm).

thylenphosphan (Abb. 4.35 **B** und **D**) wurde die Bildung des symmetrischen Penicillaminpeptiddisulfides (**c** in Abb. 4.35) zu späteren Zeitpunkten detektierbar.^[1] Dem wurde bei der weiteren Optimierung durch die in Intervallen durchgeführte Auffrischung des Reduktionsmittels TCEP entgegengewirkt. Parallel zur Zugabe einer hoch konzentrierten Lösung des Phosphans wurde auch Thiophenol erneut

^[1]Der dem Chromatogramm Abb. 4.35 **A** zugehörige Reaktionsansatz wurde ohne Zugabe von Tricarboxyethylenphosphan durchgeführt. Daher konnte die Bildung des unreaktiven Disulfides ungehindert von statten gehen.

4.2 Native chemische Verknüpfung mit Valin

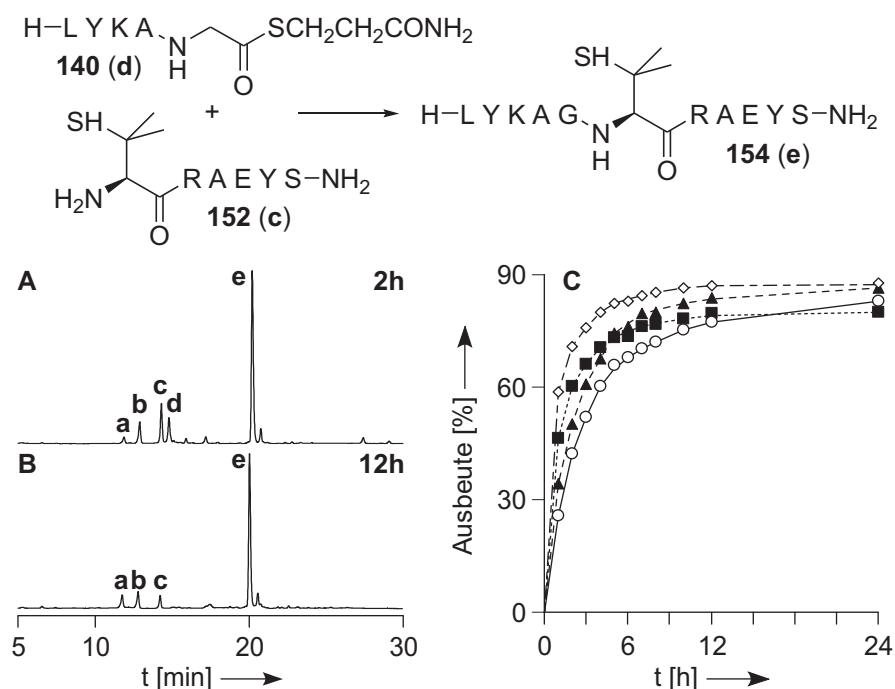


Abbildung 4.36: Optimierung der Penicillaminligation. HPLC-Spuren nach 2 (**A**) und 12 (**B**) Stunden. **C:** Kinetiken in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Bedingungen: 5 mM Peptide, 6 M GdmHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 50 mM TCEP; nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Zugabe eines Auffrischungspuffers (6 M GdmHCl, 200 mM NaH₂PO₄, 500 mM TCEP (8 % des Anfangsvolumens); 0,8% PhSH); Temperatur und pH-Wert: -◇-: T = 37 °C; pH = 8,5; -▲-: T = 37 °C; pH = 7,5; -■-: T = 25 °C; pH = 8,5; -○-: T = 25 °C; pH = 7,5; **a:** H-LYKAG-NH₂ **157**; **b:** H-LYKAG-OH **158**; **c:** H-PenRAEYS-NH₂ **152**; **d:** H-LYKAG-SPAA **140**; **e:** H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ **154**; (HPLC-Beding.: Grad. 1; λ = 280 nm).

zugesetzt. Es zeigte sich, dass bei T = 37 °C und pH = 8,5 bereits nach lediglich 2 Stunden fast 60 % des Verknüpfungsproduktes gebildet worden war. Die Reaktion war nach nur 12 Stunden mit 87 % Ausbeute abgeschlossen (Abb. 4.36).

Eine alternativ mögliche direkte Aminolyse des Thioesterpeptides durch α-Aminofunktion des Penicillaminpeptides wurde mit einem Kontrollexperiment untersucht. Unter den Ligationsbedingungen (siehe Bildunterschrift Abb. 4.36) konnte zwischen dem Valinpeptid H-VRAEYS-NH₂ **159** und dem Thioester **140** keine Verknüpfung festgestellt werden (Abb. 4.37). Damit war der Beweis für die Beteiligung der Penicillaminsulfanylfunktion erbracht. Die Penicillaminligation wurde weiterhin für die Synthese zweier längerer Peptidsegmente verwendet, bei denen es sich um Fragmente der Signaltransduktionsproteine STAT-1 bzw. der Syk-Kinase handelte. Für die Synthese des 176 - 197 Abschnitts von STAT-1 wurde der Peptidthioester **161** mit einem 1,4-fachen Überschuss des Penicillaminpeptides **162**

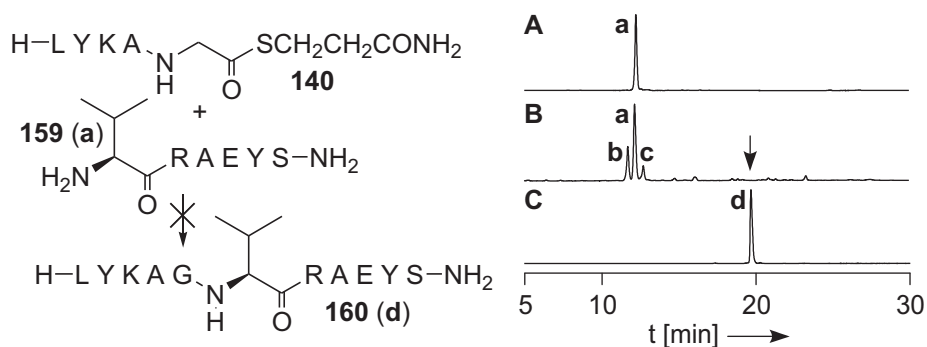


Abbildung 4.37: Kontrollexperiment - Bedeutung der Thiofunktion. Bei der Reaktion des Valinpeptides **159** mit dem Thioester **140** erfolgt auch nach 48stündiger Reaktion keine Verknüpfung. **A**: H-VRAEYS-NH₂ **159** (**a**) (Referenz); **B**: HPLC nach 48 h Reaktionszeit; **b**: Thioesteraminolyse: H-LYKAG-NH₂ **157**; **c**: Thioesterhydrolyse H-LYKAG-OH **158**; **C**: putatives Kondensationsprodukt: H-LYKAGVRAEYS-NH₂ **160** (**d**) (Referenz); (HPLC: Grad. 1; $\lambda = 280$ nm).

umgesetzt, wobei nach 24-stündiger Reaktion eine nahezu quantitative Ausbeute erzielt werden konnte (Abb. 4.38 **A**, Tab. 4.3). Auch das 103 - 124 Segment der Syk-Kinase konnte nach der gleichen Zeit durch Ligation des in 1,3-fachem Überschuss vorliegenden Penicillaminpeptides **163** mit dem Peptidthioester **164** bei fast vollständiger Umsetzung erhalten werden (Abb. 4.38 **B**, Tab. 4.3).

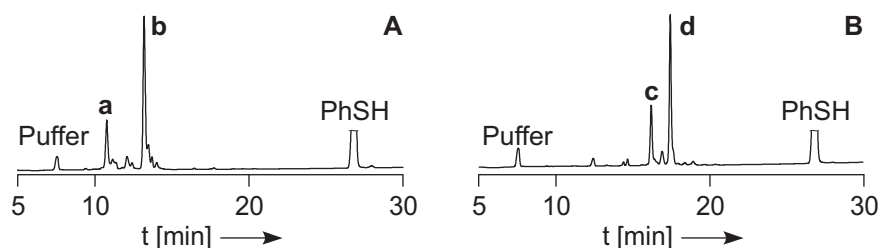


Abbildung 4.38: Synthese des STAT-1- und des Syk-Kinase-Fragmentes. Die gezeigten HPLC-Spuren geben die Zusammensetzung der Ligationsgemische nach 24 Stunden wieder. Die Penicillaminpeptide **162** bzw. **163** wurden gegenüber den Peptidthioestern **161** bzw. **164** in leichtem Überschuss eingesetzt. Die Ligationsbedingungen entsprechen den Abbildung 4.36 gemachten Angaben. **A**: Ligation des STAT-1 Segmentes 176 - 197; **B**: Ligation des Syk-Kinase Segmentes 103 - 124; **a**: H-PenAKSDQKQEQQL-NH₂ **162**; **b**: Ligationsprodukt Ac-TLQNREHETNGPenAKSDQKQEQQL-NH₂ **165**; **c**: H-PenQPKTGPFEDLK-NH₂ **163**; **d**: Ligationsprodukt Ac-LKKPFNRPGPenQPKTGPFEDLK-NH₂ **166**; (HPLC-Beding.: Grad. 3; $\lambda = 222$ nm).

4.2.3 Ligation mit höherem und hohem sterischen Anspruch

Da bei der Penicillaminligation mit dem Peptidthioester H-LYKAG-SR **140** sehr gute Resultate erzielt werden konnten, wurden auch Verknüpfungsreaktionen mit *C*-terminal sterisch anspruchsvolleren Thioestern untersucht. Die Ligation mit dem Histidinthioester H-LYKAH-SR **167** verlief schnell und es konnten nach 24 Stunden Reaktionszeit 70 % Ausbeute erhalten werden. Der Thioester **167** unterlag dabei zu maximal 8 % einer teilweisen, bereits bekannten Epimerisierung.[60]

Die Verknüpfung des Methioninthioester H-LYKAM-SR **168** verlief problemlos, wobei nach 24 Stunden 65 % Ausbeute erzielt werden konnten. Auch hier wurde ein geringfügiger Anteil eines racemisierten Ligationsproduktes identifiziert, das in Abhängigkeit von pH-Wert und Reaktionstemperatur zu maximal 4 % gebildet wurde (Abb. 4.39 **F**). Die Feststellung der Identität des racemisierten Ligationsproduktes erfolgte durch einen HPLC-Vergleich mit dem Referenzpeptid **169**, das mittels Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung von Fmoc-*d*Met-OH bereit gestellt wurde.

Bei der Ligation des sterisch gehinderten Leucinthioesters H-LYKAL-SR **170** konnten ebenfalls gute Resultate erzielt werden (Abb. 4.40). Die Ausbeute wurde durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 Stunden auf bis zu 70 % erhöht. Eine weitere Steigerung auf bis zu 80 % war durch die Verdoppelung der Menge des eingesetzten Thioesters möglich. Racemisierung wurden nicht beobachtet.

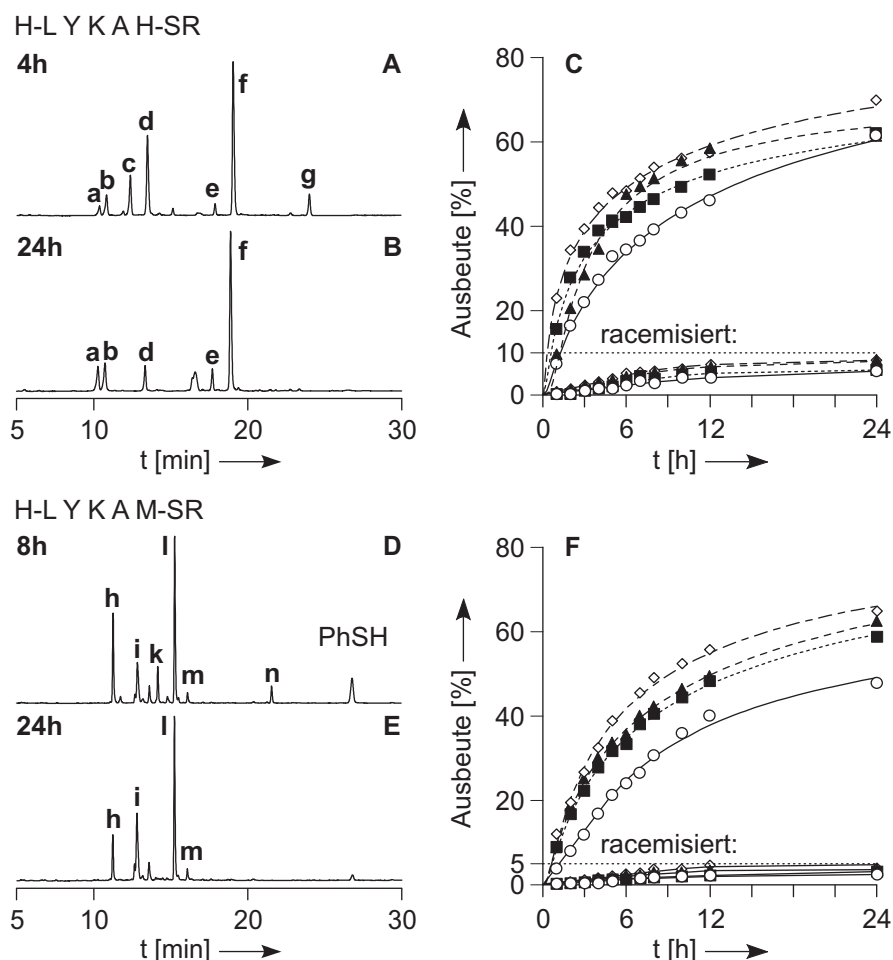


Abbildung 4.39: Penicillaminligation mit höherem sterischen Anspruch. HPLC-Spuren nach 4 (**A**) bzw. 24 (**B**) Stunden und Reaktionskinetiken in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert (**C**) der Ligation mit dem Histidinthioester **167**. HPLC-Spuren nach 8 (**D**) bzw. 24 (**E**) Stunden und Reaktionskinetiken in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert (**F**) der Ligation mit dem Methioninthioester **168**. Die Ligationsbedingungen entsprechen den in Abbildung 4.36 gemachten Angaben. Temperatur und pH-Wert: \diamond : $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 8,5$; \blacktriangle : $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,5$; \blacksquare : $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 8,5$; \circ : $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,5$; **a**: H-LYKAH-NH₂ **171**; **b**: H-LYKAH-OH **172**; **c**: H-LYKAH-SPAA **167**; **d**: H-PenRAEYS-NH₂ **152**; **e**: Ligrationsprodukt H-LYKA δ HPenRAEYS-NH₂ **173**; **f**: H-LYKAHPenRAEYS-NH₂ **172**; **g**: H-LYKAH-SPh **174**; **h**: H-PenRAEYS-NH₂ **152**; **i**: H-LYKAM-OH **175**; **k**: H-LYKAM-SPAA **168**; **l**: Ligrationsprodukt H-LYKAMPenRAEYS-NH₂ **176**; **m**: H-LYKA δ MPenRAEYS-NH₂ **169**; **n**: H-LYKAM-SPh **177**; (HPLC-Bedingungen: Gradient 2 (H-LYKAH-SR) bzw. Gradient 3 (H-LYKAM-SR); $\lambda = 280\text{ nm}$).

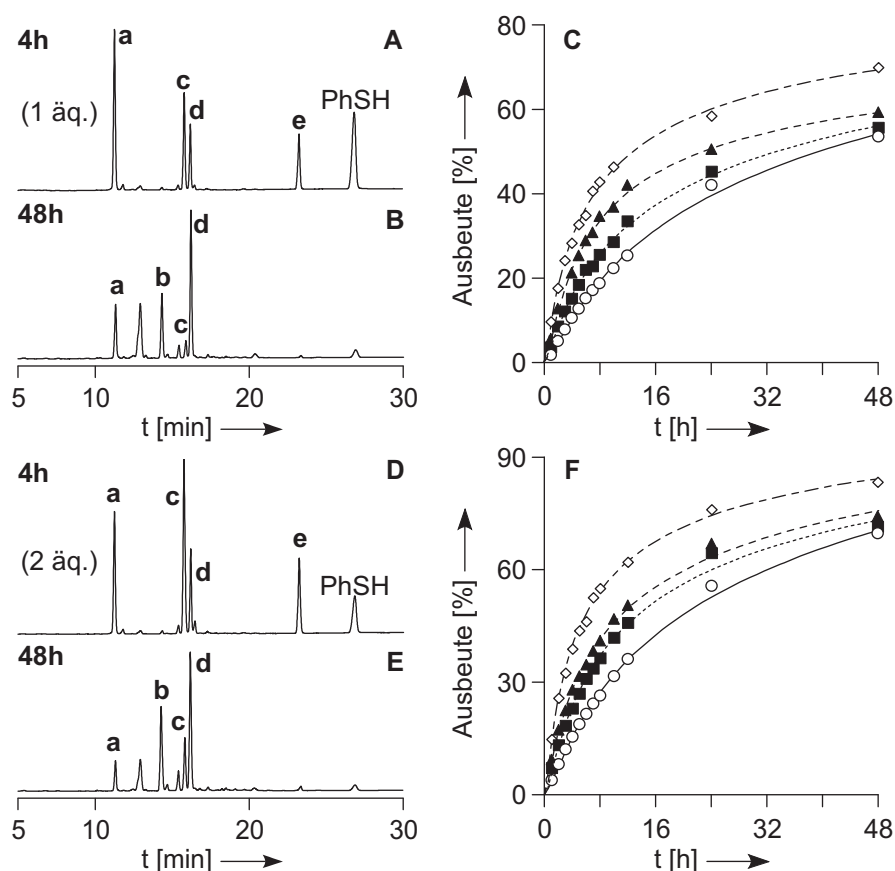


Abbildung 4.40: Penicillaminligation mit hohem sterischen Anspruch. HPLC-Spuren nach 4 (**A** (1 äq. **170**)/**D** (2 äq. **170**)) bzw. 48 (**B** (1 äq. **170**)/**E** (2 äq. **170**)) Stunden und Reaktionskinetiken in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert (**C** (1 äq. **170**)/**F** (2 äq. **170**)) der Ligation mit dem Leucinthioester **170**. Die Ligationsbedingungen entsprechen den in Abbildung 4.36 gemachten Angaben. Nach 24 Stunden wurde die Auffrischung der Reagenzien wiederholt (Zugabe von Puffer 16 % und Thiophenol 1,6 % des Ausgangsvolumens). Temperatur und pH-Wert: \diamond : $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 8,5$; \blacktriangle : $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,5$; \blacksquare : $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 8,5$; \circ : $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,5$; **a**: H-PenRAEYS-NH₂ **152**; **b**: H-LYKAL-OH **178**; **c**: H-LYKAL-SPAA **170**; **d**: Ligrationsprodukt H-LYKALPenRAEYS-NH₂ **179**; **e**: H-LYKAL-SPh **180**; (HPLC-Bedingungen: Gradient 3; $\lambda = 280\text{ nm}$).

4.2.4 Metall-basierte Entschwefelung

Für die Entschwefelung von Ligationsprodukten ist die Anwendung verschiedener Hydrierkatalysatoren beschrieben worden.[144] Bei Verwendung von Palladium auf Trägern wie Al_2O_3 oder Kohlenstoff wurde zur Reduktion der schwefel-haltigen Aminosäure Wasserstoffgas zugeführt. Die Präparation von Raney-Nickel erfolgte durch Umsetzung von Nickelsalzen mit NaBH_4 . Hierbei wurde an der Katalysatoroberfläche Wasserstoff adsorbiert, der bei Umsetzung der schwefel-haltigen Peptide die Desulfurierung herbeiführte. Für die Überführung der Penicillylreste der Glycinverknüpfungsprodukte **154**, **165** und **166** in Valinreste wurden zunächst auch metall-basierte Methoden evaluiert. Als Katalysator kam frisch hergestelltes Raney-Nickel zum Einsatz und die Peptide wurden in 20 %igen Essigsäure gelöst. Die Ausbeuten für das Modellpeptid **154** und für das Syk-Kinase-Fragment **166** waren mäßig und betrugen 61 % respektive 54 % (Abb. 4.41, Tab. 4.3). Die Entfernung der Thiofunktion aus dem STAT-1-Peptid **165** schlug gänzlich fehl. Es war weder möglich, das entsprechende Valinpeptid zu erhalten, noch konnte das Penicillaminpeptid zurückgewonnen werden. Die Ursache hierfür waren wahrscheinlich Adsorptionsvorgänge an der Oberfläche des Katalysators. Auch nach mehrfachen Extraktionsversuchen mit Trifluoressigsäure konnte kein peptidisches Material zurückgewonnen werden.

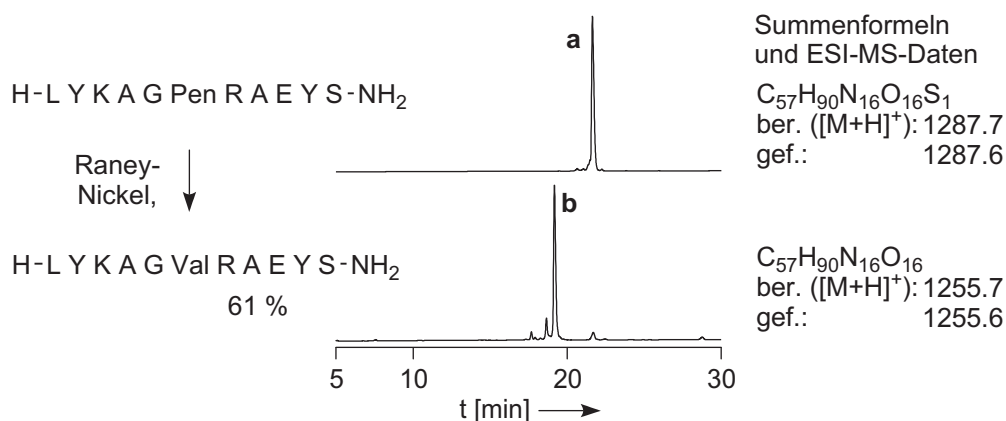


Abbildung 4.41: Metall-basierte Entschwefelung am Beispiel der Reaktion von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ **154** (a) zu H-LYKAGVRAEYS-NH₂ **160** (b; Rohchromatogramm) mit den ESI-MS-Daten von Edukt und Produkt. Bedingungen: 1 mM Peptid, 20% Essig, Raney-Nickel. (HPLC-Beding.: Grad. 1; $\lambda = 280$ nm).

4.2.5 Metall-freie Entschwefelung

Die metall-freie Entschwefelung (siehe auch Abschnitt 2.10, Abb. 2.9) von Cysteinylpeptiden gelang durch eine Radikalkettenreaktion. In der Startreaktion erfolgte zunächst die homolytische Abstraktion des Wasserstoffatoms der Cystein-Thiofunktion durch den wasserlös. Radikalstarter 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-

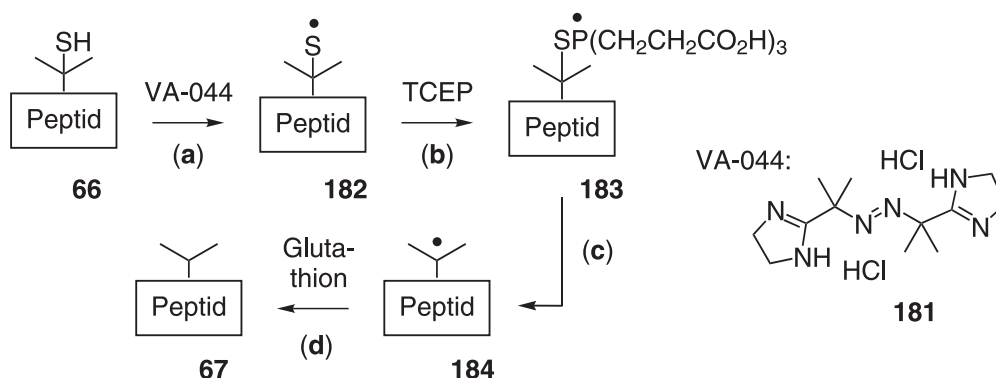


Abbildung 4.42: Angenommener Mechanismus der metall-freien Entschwefelung von Penicillaminpeptiden. Durch den thermischen Zerfall des Radikalstarters VA-044 **181** wird die Abstraktion des Wasserstoffatoms der Mercaptogruppe des Penicillamins in **66** möglich (Schritt **a**). Das dabei gebildete Thiylradikal **182** reagiert mit TCEP zu einer Phosphoranylradikalspezies **183** (Schritt **b**), bei deren Zerfall ein tertiäres Alkylradikal **184** entsteht (Schritt **c**). Dessen Sättigung erfolgt durch Übertragung eines Wasserstoffatoms von dem der Glutathionsulfanylgruppe des Sättigung (Schritt **d**).

yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) **181**. Das dabei entstehende Thiylradikal (analog zu **182**) reagierte danach mit dem Reduktionsmittel Triscarboxyethylenphosphan zu einer Phosphoranylradikalspezies (analog zu **183**), deren Zerfall die Bildung eines Alanylradikals (analog zu **184**) herbeiführte. Bei dessen Sättigung wurde als Zielverbindung das Alaninpeptid gebildet. Dabei wurde ein Wasserstoffatom von einem noch nicht umgesetzten Cysteinpeptid übertragen. Die Thiole EtSH und *t*BuSH wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt, um die Reaktion durch die Bereitstellung von Wasserstoffatomen zu beschleunigen.[141]

Durch Anwendung dieser bekannten Bedingungen (VA-044 **181**, TCEP, EtSH, *t*BuSH) gelang die Entschwefelung des Modellpeptides **154** zum Valinpeptid **160**. Allerdings ging die Reaktion mit der Bildung zahlreicher Nebenprodukte einher. Bei der Suche nach Möglichkeiten für eine Verbesserung dieses unbefriedigenden Ergebnisses wurde ein Literaturhinweis gefunden, demzufolge *tert*-Butylmercaptan mit primären Alkylradikalen langsamer reagiert als z. B. das primäre Octylthiol.[31] In Analogie konnte angenommen werden, dass auch der Radikalbildungsprozess am tertiären Thiol von Penicillamin langsamer verläuft als am primären Thiol des Cysteins (Abb. 4.42, Schritt **a**). Zur Kompensation erfolgte deshalb die Anhebung der Reaktionstemperatur von 37 °C auf 65 °C und eine Konzentrationserhöhung des Radikalstarters von ursprünglich 5 mM auf 20 mM.

Da die Stabilität von tertiären Alkylradikalen wie **184**, das bei Zerfall der Phosphoranylspezies **183** gebildet wird (Schritt **c**), höher ist als die primären Alkylradikale, sind für deren Sättigung effektivere Wasserstoffquellen als Ethyl- oder *tert*. Butylmercaptan notwendig. Chatgililoglu *et al.* konnten zeigen, dass Gluta-

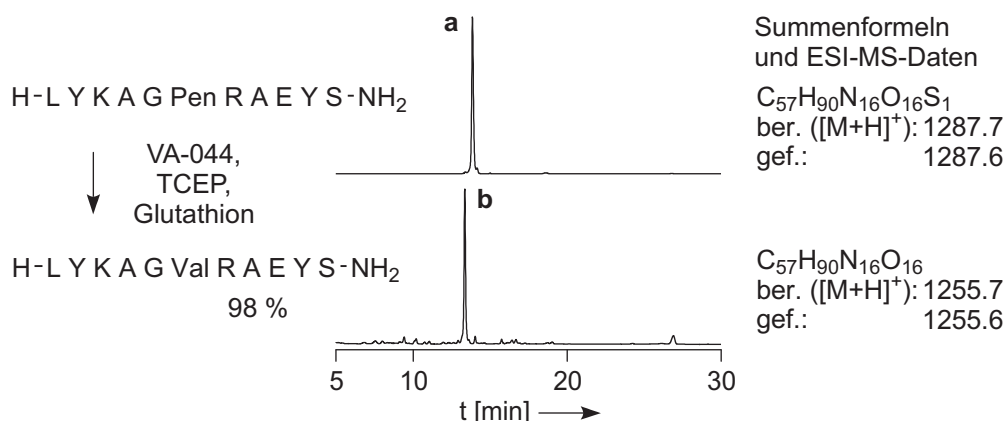


Abbildung 4.43: Metall-freie Entschwefelung am Beispiel der Reaktion von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ **154** (a) zu H-LYKAGVRAEYS-NH₂ **160** (b; Rohchromatogramm) mit den ESI-MS-Daten von Edukt und Produkt. Bedingungen: 0,5 – 2 mM Peptid, 100 mM NaH₂PO₄, 3 M GdmHCl, 20 mM VA-044, 250 mM TCEP, 40 mM Glutathion, T = 65 °C, pH = 6,5.

thion im Vergleich zu Mercaptoethanol bei der Sättigung des 2'-Deoxyuridin-1'-yl-Radikales doppelt so schnell reagiert.[32] Diese Erkenntnis wurde auf das vorliegende Problem angewendet und das EtSH/*t*BuSH-Gemisch durch Glutathion ersetzt.

Durch diese Modifikationen der Reaktionsbedingungen konnten alle Penicillaminpeptid in teilweise sehr guten Ausbeute entschwefelt werden (Abb. 4.43, Tab. 4.3). Auch die Entfernung des überzähligen Schwefelatoms des STAT-1-Peptidfragmentes **165**, die bei Anwendung der metall-basierten Methode fehl-schlug, war unter den modifizierten metall-freien Bedingungen möglich.

Eine Besonderheit ergab sich bei dem methionin-haltigen Peptid **176**, da als Begleiterscheinung die Oxidation der Thioethergruppe auftrat. Diese Nebenreaktion konnte durch Senken der Reaktionstemperatur auf 37 °C unterdrückt werden. Unter diesen Bedingungen war die Überführung in das Valinpeptid **186** nach sechs Stunden abgeschlossen.

4.2.6 Zusammenfassung

Die Anwendung des kommerziell verfügbaren Penicillamin als Vorläufer von Valin in der Ligations-Entschwefelungs-Strategie wurde demonstriert. Die Verknüpfung von Glycin-, Histidin-, Methionin- und sogar Leucinthioestern konnte in guten Ausbeuten gezeigt werden. Hierbei war es von Bedeutung, dass Thiophenol als alleiniges Additiv verwendet wurde und dass durch eine regelmäßig erfolgende Zugabe frischen Triscarboxyethylenphosphans die Reduktion des Penicillamins sichergestellt war. Bereits bekannte metall-freie Bedingungen kamen für die Entschwefelung der Ligationsprodukte zum Einsatz. Hervorgehoben werden kann,

4.2 Native chemische Verknüpfung mit Valin

dass im Rahmen einer Optimierung dieser Desulfurierungsbedingungen die übel riechenden Thiole EtSH und *t*BuSH durch das erheblich effektivere und zudem geruchsneutrale Glutathion ersetzt wurden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erschließung von Valinverknüpfungsstellen wurde von Danishefsky *et al.* beschrieben.[34] Hierbei wurde auf ein γ -Mercaptoderivat des Valins zurückgegriffen, wodurch das Thiol-Thioester-Gleichgewicht durch eine sterisch weniger gehinderte primäre Sulfanylfunktion bedient werden kann. Peptidfragmentverknüpfungen mit Peptidthioestern gelangen dadurch mit erheblich kürzeren Reaktionszeiten. Zudem konnte sogar die sterisch äußerst anspruchsvolle Verknüpfung mit einem Threoninthioester realisiert werden. Allerdings setzt diese Herangehensweise im Gegensatz zur Ligation mit Penicillamin eine mehrstufige Synthese des hierfür notwendigen γ -Mercaptovalinbausteines voraus.

Tabelle 4.3: Ausbeuten der Penicillaminkupplungen und Entschwefelungen

Penicillin-amin-peptid	Peptid-thio-ester	Ligations- produkt (Sequenz)	Aus- beute [%]	Reak- tions- zeit [h]	Entschwefelungs- produkt (Sequenz)	Entschwefelung Ausbeute [%]			
152	140	LYKAGPenRAEYS	154	87	12	LYKAGVRAEYS	160	61 ^[f]	98 ^[f]
152	167	LYKAHPenRAEYS	172	70	24	LYKAHVRAEYS	185	— ^[g]	93 ^[f]
152	168	LYKAMPenRAEYS	176	65	24	LYKAMVRAEYS	186	— ^[g]	77 ^[f]
152	170	LYKALPenRAEYS	179	70 ^[a] /82 ^[b]	48	LYKALVRAEYS	187	— ^[g]	79 ^[f]
162	161	TLQNRHETNGPen AKSDQKQEQL	165	78 ^[c]	24	TLQNRHETNGV AKSDQKQEQL	188	0 ^[h]	72
163	164	LKKPFNRPQGPen QPKTGPFEDLK	166	87 ^[d]	24	LKKPFNRPQGV QPKTGPFEDLK	189	54	91
159	140	LYKAGVRAEYS	160	0 ^[e]	—	—	—	—	—

^a1 äq. H-LYKAL-SR **170**. ^b2 äq. H-LYKAL-SR **170**. ^cDas Penicillaminpeptid **162** wurde in 1,4fachem Überschuss eingesetzt. ^dDas Penicillaminpeptid **163** wurde in 1,3fachem Überschuss eingesetzt. ^eEs erfolge auch nach 48 Stunden keine Verknüpfung der Peptidfragmente. ^fDie in den Entschwefelungsexperimenten verwendeten Peptide **154**, **172**, **176** und **179** wurden nicht durch Ligation sondern mittels Festphasenpeptidsynthese gewonnen. ^gDie metall-basierte Entschwefelung der Peptide **172**, **176** und **179** wurden nicht durchgeführt. ^hNach 8 Stunden Reaktionszeit konnten weder das Startmaterial noch das Reaktionsprodukt isoliert werden.

4.3 Ligation mit internem Cystein

4.3.1 Einleitung und Konzept

Im letzten Abschnitt der Promotion wurde die beschleunigende Wirkung sequenz-interner Cysteine auf die thioester-basierte Fragmentverknüpfung untersucht. Bei einer solchen Ligationsreaktion vollzieht sich der Acyltransfer über ein macrocyclisches Ringintermediat. Im Gegensatz dazu treten im Reaktionsgeschehen der nativen chemischen Ligation mit *N*-terminalem Cystein kleinere Ringe auf. Durch einen nucleophilen Angriff der α -Aminogruppe im intermediären Thioester wird in einer bevorzugten 5-*exo-trig* Ringschlussreaktion ein fünfgliedriges Tetraederintermediat gebildet (Abb. 4.44 A). Danach entsteht durch den Austritt der Mercaptofunktion die Peptidbindung.

Bei der zucker-vermittelten Ligation befindet sich die für die Übernahme des Acyldonors wichtige Mercaptofunktion nicht in direkter Nachbarschaft zum *N*-Terminus. Sie ist vielmehr an einem Kohlenhydratrest positioniert, der *O*- bzw. *N*-glycosidisch mit einem Serin, Threonin oder Asparagin innerhalb der Peptidsequenz verknüpft ist. Zwischen dieser glycosylierten Aminosäure und dem *N*-Terminus können bis zu fünf Aminosäurereste insertiert sein[112], so dass der Bildung des Tetraederintermediates Macrocyclisierungen 14- bis 29-gliedriger Ringe vorausgehen (Abb. 4.44 B). Ein ähnlicher Verlauf vollzieht sich bei der Ligation vermittelt Seitenkettenauxiliar. Dieses besteht aus einem einfacheren *N*-Cyclohexyl-2-mercaptoacetamidgerüst, das über eine Esterbindung mit der Seitenkette eines Serines oder einer Asparagin- bzw. Glutaminsäure mit dem Peptid verknüpft ist.[92] Ein erfolgreicher *S*→*N*-Acyltransfer setzt dabei die Bildung eines 14- bis 16-gliedrigen Ringes voraus (Abb. 4.44 C).

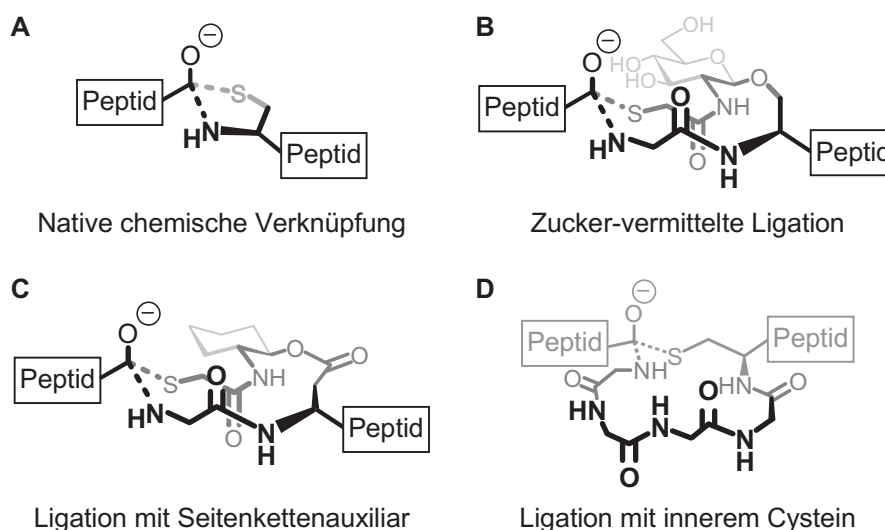


Abbildung 4.44: Tetraederintermediate verschiedener Ligationsreaktionen

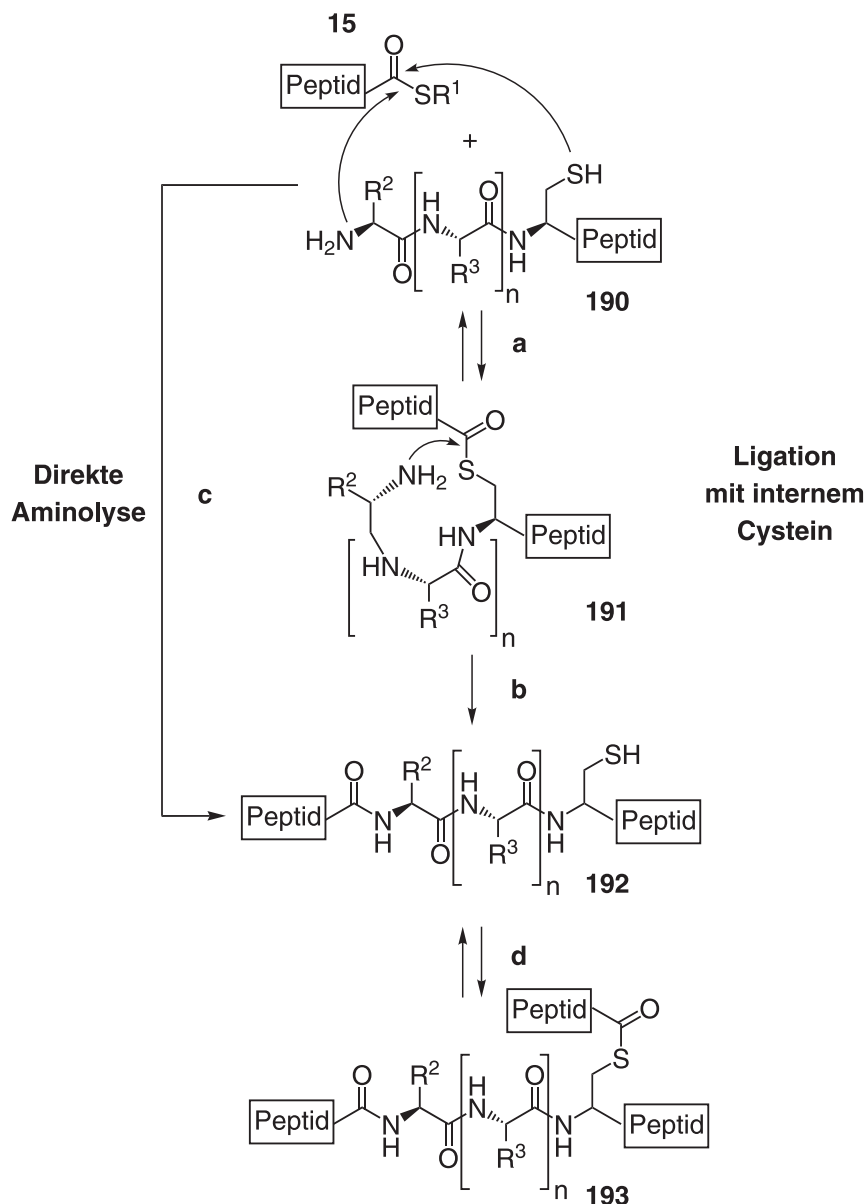


Abbildung 4.45: Schematischer Ablauf der Ligation mit internem Cystein. Nach dem reversiblen Thiolaustausch (Schritt **a**) findet in dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Verschiebung des Acylrestes statt (Schritt **b**). Dazu muss der *N*-terminal an das Cystein angrenzende Peptidabschnitt in **191** eine Schleifenkonformation annehmen, die zur Bildung eines cyclischen Tetraederintermediates (Abb. 4.44 **D**) befähigt. Bei sterisch ungehindertem *N*-Terminus ($R^2 = H$) resultiert die Produktbildung teilweise aus einer direkten Thioesteraminolyse (Schritt **c**). Verläuft die Fragmentkondensation ausreichend schnell, kann das verzweigte Intermediat **193** in einer weiteren Thiolaustauschreaktion mit noch vorhandenem Thioester gebildet werden (Schritt **d**) (siehe Abschnitt 4.3.2).

4.3 Ligation mit internem Cystein

Die Bildung eines analogen Intermediates kann bei der Ligation mit internem Cystein erwartet werden. Diese Verknüpfungsreaktion, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht wurde, bedarf keines speziellen Synthesebausteines. Das Thiol-Thioester-Gleichgewicht wird von einem sequenz-internen Cystein in **190** bedient, so dass die Verschiebung der Acylkomponente von dieser Thiolfunktion zum α -Aminoterminus erfolgt (Abb. 4.45). Als Voraussetzung dafür kann die Ausbildung eines macrocyclischen Tetraederintermediates (Abb. 4.44 D) angesehen werden. Es wurde erwartet, dass dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend wird, wenn anstelle 5- oder 6-gliedriger Ringe macrocyclische Ringe gebildet werden müssen. Außerdem wurde angenommen, dass die Reaktion von der Position des Cysteins und der daran *N*-terminal angrenzenden Aminosäuresequenz abhängen wird.

4.3.2 Glycin und Alanin als *N*-terminales Nucleophil

In den ersten Ligationsexperimenten wurde die Verknüpfung des Peptidthioesters H-LYRAG-SR **194** mit den Peptiden **195** bis **221** mit *N*-terminalem Glycinrest untersucht. Der sequenz-interne Cysteinbaustein war hierbei bis zu fünf Aminosäureeinheiten vom *N*-Terminus entfernt (Abb. 4.45, R^2 , $R^3 = H$; $n = 0 - 4$). Die Peptide wurden in einer Konzentration von 5 mM in einem entgasten Phosphatpuffer (100 mM NaH_2PO_4) bei pH = 7,0 gelöst, der 6 M Guanidini-

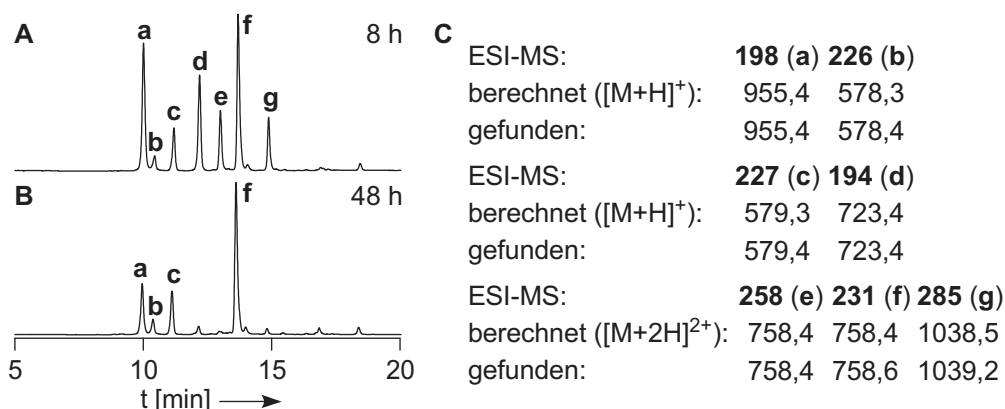


Abbildung 4.46: Verknüpfung von H-LYRAG-SR **194** und H-GGGGCRAEYS-NH₂ **198**. Reaktionsbedingungen: 100 mM NaH_2PO_4 ; 6 M GdmHCl; 25 mM TCEP; pH = 7,0; T = 25 °C; Peptidkonzentration 5 mM; **A**: HPLC-Spur nach 8 Stunden Reaktionszeit; **B**: HPLC-Spur nach 48 Stunden Reaktionszeit; **C**: ESI-MS-Daten; **a**: H-GGGGCRAEYS-NH₂ **198**; **b**: H-LYRAG-NH₂ **226**; **c**: H-LYRAG-OH **227**; **d**: H-LYRAG-SPAA **194**; **e**: H-GGGGC(H-LYRAG)RAEYS-NH₂ **258**; **f**: H-LYRAGGGGGCRAEYS-NH₂ **231**; **g**: H-LYRAGGGGGC(H-LYRAG)RAEYS-NH₂ **285**; (HPLC-Bedingungen: Gradient 4; $\lambda = 280$ nm).

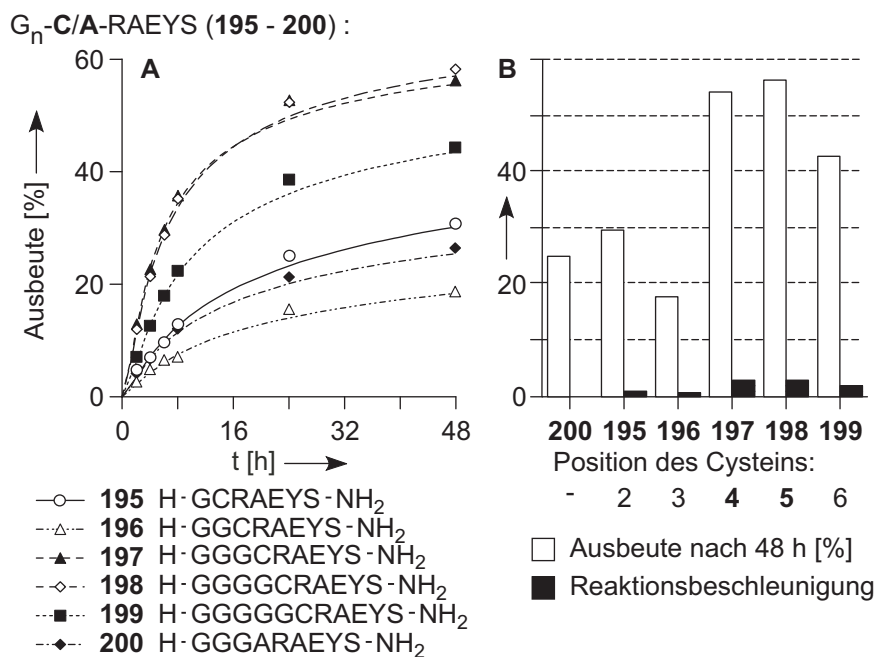


Abbildung 4.47: Ligationskinetiken und Reaktionsbeschleunigungsraten von Glycinpeptiden. **A:** Kinetiken der Ligationen mit den Peptiden G-G_n-CRAEYS **195 - 199**; **B:** Gegenüberstellung der Verknüpfungsausbeuten nach 48 Stunden und Beschleunigungen der anfänglichen Reaktionsraten bezogen auf das cystein-freie Glycin-Kontrollpeptid **200**.

umhydrochlorid und 25 mM Triscarboxyethylenphosphan enthielt. Thiophenol (5 Vol-%) wurde als alleiniges Additiv zur Beschleunigung der Reaktionen zugegeben, deren Durchführung durch Inkubation bei 25 °C erfolgte. Der Verlauf der Ligationen wird durch die in Abbildung 4.46 gezeigte HPLC-Analytik der Reaktion zwischen dem Thioester **194** und dem Glycinpeptid H-GGGGCRAEYS-NH₂ **198** illustriert. Die HPLC-Spur nach 48 Stunden zeigt vier Hauptkomponenten: das Ligationsprodukt **231** (f in Abb. 4.46), nicht-reagiertes Cysteinylopeptid **198** (a) und die Thioesterabbauprodukte H-LYRAG-NH₂ **226** (b) und H-LYRAG-OH **227** (c). Die Bildung des Peptidamides **226** könnte aus der Anwesenheit von Guanidin im Ligationspuffer resultieren. Dieses könnte ebenfalls einen nucleophilen Angriff auf den *C*-Terminus des Thioesters ausführen. Bei Zerfall des dabei entstehenden Intermediates würde sich das Peptidamid **226** bilden. Alternativ könnte auch eine direkte Aminolyse durch Ammoniak mechanistisch in Betracht kommen, das sich infolge der Hydrolyse des Guanidins gebildet haben könnte. In Abwesenheit des denaturierenden Reagenzes Guanidiniumhydrochlorid trat die Bildung des Peptidamides **226** nicht auf (siehe Abb. 4.51). Die HPLC-Spur nach acht Stunden liefert zusätzliche Informationen und belegt das Auftreten von Reaktionsintermediaten wie dem nicht-umgelagerten Thioesterintermediat **258** (e) und dem als Seitenkettenthioester vorliegenden Ligationsprodukt **285** (g). Beide Intermediate

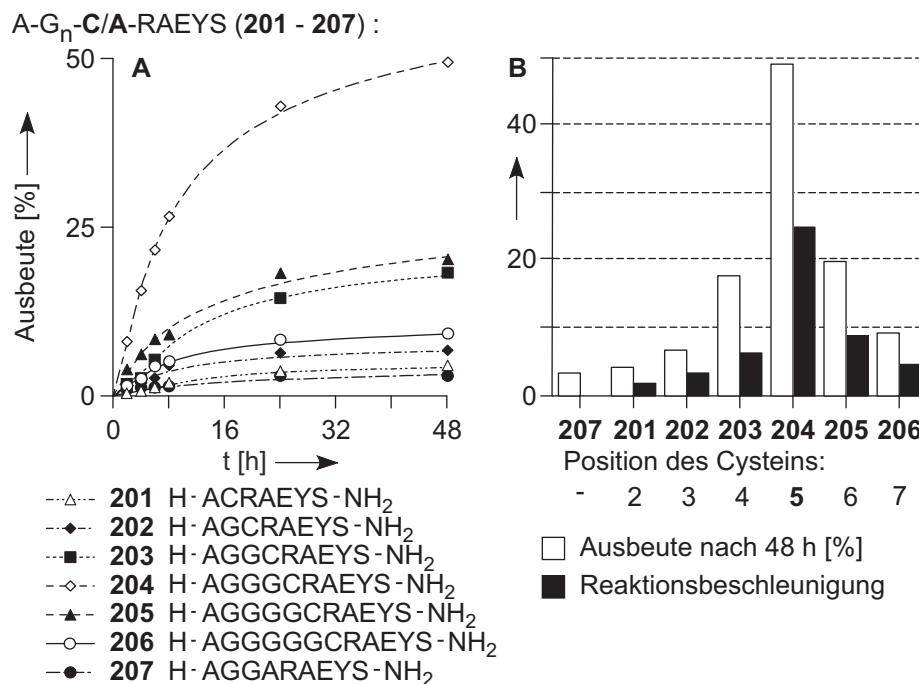


Abbildung 4.48: Ligationskinetiken und Reaktionsbeschleunigungsraten von Alaninpeptiden. **A:** Kinetiken der Ligationen mit den Peptiden A-G_n-CRAEYS **201 - 206**; **B:** Gegenüberstellung der Verknüpfungsausbeuten nach 48 Stunden und Beschleunigungen der anfänglichen Reaktionsraten bezogen auf das cystein-freie Alanin-Kontrollpeptid **207**.

waren gegenüber zugegebener Natronlauge nicht stabil, sondern unterlagen einer Hydrolysereaktion.

Die höchsten Reaktionsraten konnten mit den Peptiden **197** und **198** erzielt werden, in denen sich das Cystein an vierter respektive fünfter Position befand (siehe Abb. 4.47 A/B). Aber auch das cystein-freie Ala-Peptid H-GGGARAEYS-NH₂ **200** reagierte mit einer signifikanten Reaktionsrate. Diese war lediglich um den Faktor 3 kleiner, als die der am schnellsten kuppelnden Cysteinpeptide **197** und **198** (Abb. 4.47 B). Diese Beobachtung resultiert aus der direkten Aminolyse des Thioesters (siehe Abb. 4.45) durch den sterisch ungehinderten *N*-Terminus des Alaninpeptides **200**. Da auch die Cysteinpeptide **195 - 199** über ein *N*-terminales Glycin verfügten, erfolgte auch hier die Bildung der Verknüpfungsprodukte zu einem Teil über die direkte Aminolysereaktion. Das Peptid **196**, in dem sich der Cysteinrest an zweiter Position befand, reagierte sogar um den Faktor 0,6 langsamer als das thiol-freie Kontrollpeptid **200** (Abb. 4.47 B). Das Auftreten dieses Befundes könnte durch die ungünstige Ringgröße des cyclischen Tetraederintermediates erklärt werden. Da die Bildung mittlerer 11-gliedriger Ringe benachteiligt ist, würde die Acylkomponente nach der Thiolaustauschreaktion an der Cysteinseitenkette verbleiben. Dadurch wäre die Konzentration an freiem Thioester für eine

direkte Aminolysereaktion vermindert. Der über die Thiolseitenkette angebundene Thioesterteil würde zudem sterische Hinderung ausüben und die Reaktivität des α -Aminoterminus vermindern.

Um die direkte Aminolysereaktion in den Hintergrund zu drängen, wurde der sterische Anspruch durch den Austausch der *N*-terminalen Glycinreste durch Alanin erhöht. Die Verknüpfung des Thioesters **194** mit den Peptiden **201** - **207** erfolgte unter den oben genannten Bedingungen (siehe Abb. 4.46). Im Vergleich zum cystein-freien Glycinkontrollpeptid **200** war die Reaktionsrate des cystein-freien Alaninkontrollpeptides **207** drastisch reduziert und nach 48 Stunden waren lediglich 3,1 % des Verknüpfungsproduktes entstanden. Das Peptid H-AGGGCRAEYS-NH₂ **204** mit an fünfter Stelle befindlichem Cystein reagierte 25-fach schneller als das Kontrollpeptid **207** (Abb. 4.48 A/B). Auch wurde ein signifikanter Unterschied zu den homologen Peptiden **203** und **205** deutlich.

4.3.3 Ligationen mit erhöhtem sterischen Anspruch

Verknüpfungsreaktionen mit *C*-terminalen Prolinthioestern sind aufgrund sterischer Hinderung stark verlangsamt.[60] Asparaginsäurethioester unterliegen durch den Angriff der Seitenkettenfunktion auf die Thioestergruppe der Bildung von Bernsteinsäureanhydriden und der damit verbundenen Folgereaktionen: Hydroly-

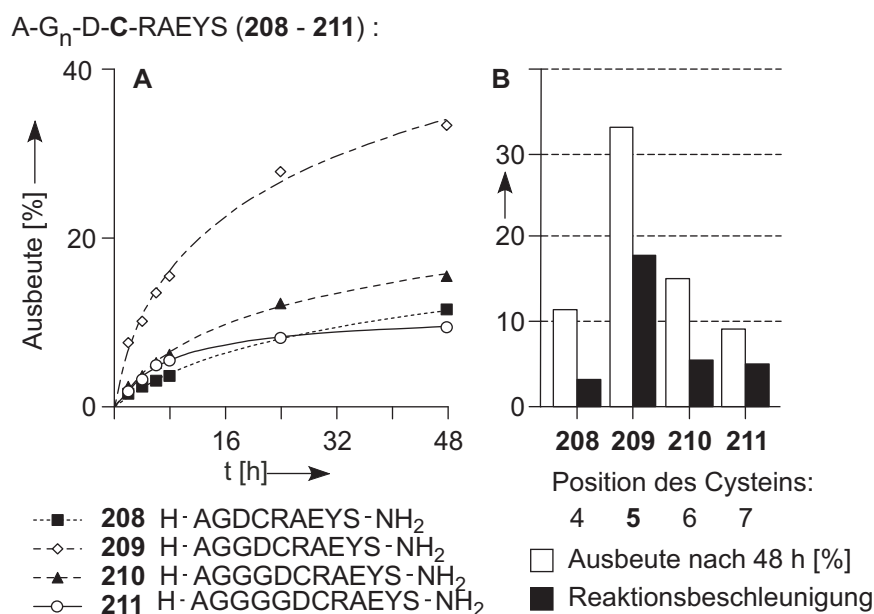


Abbildung 4.49: Ligationenkinetiken und Reaktionsbeschleunigungsraten von Asparat-peptiden. **A:** Kinetiken der Ligationen mit den Peptiden A-G_n-DCRAEYS **208** - **211**; **B:** Gegenüberstellung der Verknüpfungsausbeuten nach 48 Stunden und Beschleunigungen der anfänglichen Reaktionsraten bezogen auf das cystein-freie Alanin-Kontrollpeptid **207**.

4.3 Ligation mit internem Cystein

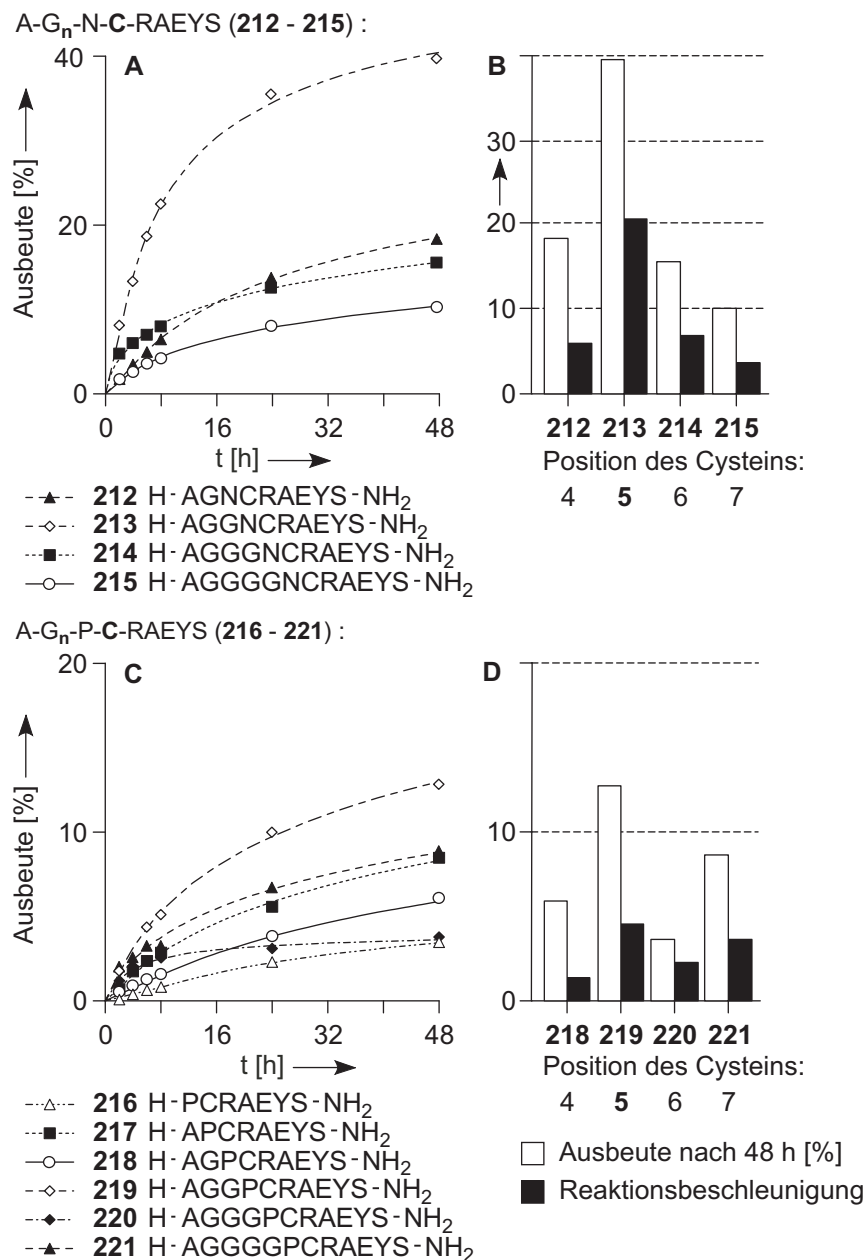


Abbildung 4.50: Ligationskinetiken und Reaktionsbeschleunigungsraten von Asparaginpeptiden und Prolinpeptiden. **A:** Kinetiken der Ligationen mit A-G_n-NCRAEYS **212 - 215**; **C:** Kinetiken der Ligationen PCRAEYS **216** und A-G_n-PCRAEYS **217 - 221**; **B/D:** Gegenüberstellung der Verknüpfungsausbeuten nach 48 Stunden und Beschleunigungen der anfänglichen Reaktionsraten bezogen auf das cystein-freie Alanin-Kontrollpeptid **207**.

se, Racemisierung und Bildung von β -Peptiden.[138] Asp/Pro-Cys Ligationsstellen sind durch konventionelle native chemische Ligationen nur mit starken Ein-

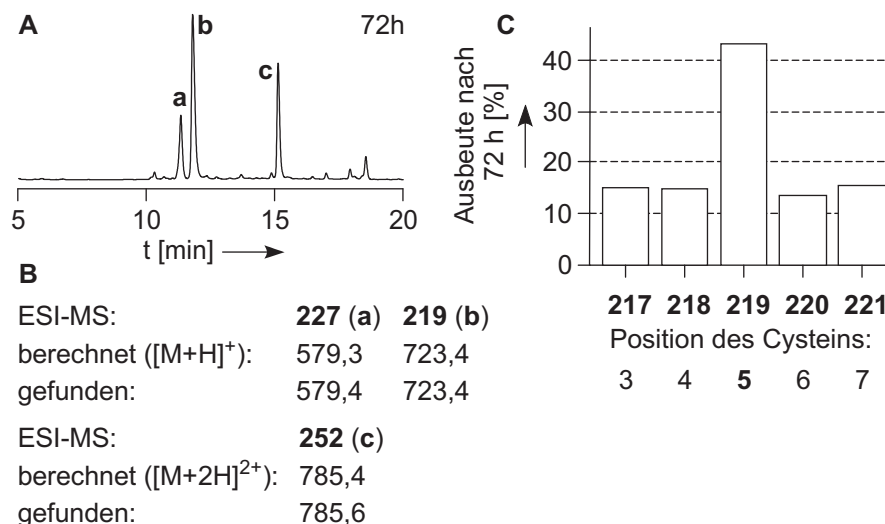


Abbildung 4.51: Verknüpfung von Prolin-Peptiden unter optimierten Bedingungen. **A:** Verknüpfung von H-LYRAG-SR **194** und H-AGGPCRAEYS-NH₂ **219** unter optimierten Bedingungen: 100 mM NaH₂PO₄; pH = 8,0; T = 35 °C; Thioester 5 mM; Cysteinpeptid 10 mM; HPLC-Spur nach 8 Stunden Reaktionszeit; **B:** ESI-MS-Daten; **a:** H-LYRAG-OH **227**; **b:** H-AGGPCRAEYS-NH₂ **219**; **c:** H-LYRAGAGGPCRAEYS-NH₂ **252**; (HPLC-Bedingungen: Gradient 4; λ = 280 nm); **C:** Ausbeuten nach 72 Stunden Reaktionszeit unter optimierten Bedingungen.

schränkungen zugänglich, könnten aber durch eine Ligation mit sequenz-internem Cystein ohne Nebenreaktionen erschlossen werden. Der Effekt höheren sterischen Anspruches wurde daher anhand von Asparaginsäure und Prolin untersucht. Daneben erfolgte die Evaluierung der Ligationseigenschaften von Peptiden mit Asn-Cys-Bindungen. Die betreffenden Verknüpfungsstellen wurden um 2 - 5 Aminosäuren in Richtung des *C*-Terminus verschoben. Die Peptide H-AGGDCRAEYS-NH₂ **209** und H-AGGNCRAEYS-NH₂ **213** mit sequenz-internem Cystein an fünfter Position reagierten 18- bis 21-fach schneller als das Kontrollpeptid **206** (Abb. 4.49 **B** und Abb. 4.50 **B**). Die Reaktivität der prolin-haltigen Peptide **216** - **221** war geringer,

wobei aber auch hier mit dem 4Xaa-Cys-Peptid **219** die höchsten Ligrationsraten erzielt werden konnten (Abb. 4.50 **D**). Die unterschiedlichen Reaktivitäten des Glycinpeptides **204**, des Asparaginsäurepeptides **209**, des Asparaginpeptides **213** bzw. des Prolinpeptides **219** können in erster Linie auf sterische Einflüsse der Aminosäuren zurückgeführt werden.

Um bei den Verknüpfungen der Prolinpeptide **216** - **221** bessere Ergebnisse zu erzielen, wurden die Reaktionsbedingungen modifiziert. Der Ligrationspuffer enthielt nunmehr nur noch NaH₂PO₄ (100 mM) und pH-Wert sowie Reaktionstemperatur wurden auf pH = 8,0 bzw. T = 35 °C erhöht. Es erfolgte eine

4.3 Ligation mit internem Cystein

Verdopplung der Konzentration der Prolinpeptide auf 10 mM, so dass gegenüber dem Thioester **194** ein Verhältnis von 2 : 1 vorherrschte. Um vor der Durchführung der HPLC-Analytik die Abwesenheit von Disulfiden sicher zu stellen, wurde eine TCEP-Lösung (250 mM) zugesetzt.

Die Kupplungsausbeuten konnten durch diese Modifikationen um den Faktor 1,8 - 3,5 auf bis zu 43,5 % gesteigert werden. Als Begleitkomponenten wurden lediglich das im Überschuss eingesetzte Prolinpeptid und das Thioesterhydrolyseprodukt **227** detektiert (Abb. 4.51). Da die Durchführung der Reaktion in Abwesenheit von Guanidin erfolgte, wurde trat das Peptidamid H-LYRAG-NH₂ **226** nicht als Abbauprodukt des Thioester **194** in Erscheinung (vgl. Abb. 4.46). Wieder zeigte das Peptid **219** mit Cystein in Position 5 im Vergleich zu den anderen Prolinpeptiden die höchste Reaktivität bezüglich der Ligation mit internem Cystein.

4.3.4 Weiterführende Experimente

Die Untersuchung einer allgemeinen Anwendbarkeit der Strategie erfolgte anhand zweier in der Natur auftretender Beispiele. Es wurden hierfür Peptidabschnitte eines aus *A. platyrhynchos* isolierten MHC-II-Klasse Antigens und einer DNA Helicase aus *D. discoideum* mit Asp-Cys-Abfolgen gewählt, die durch konventionelle Ligationen nicht zugänglich sind. Die Peptidfragmente wurden mit Cystein in Position 5 hergestellt. Im *N*-terminal daran angrenzenden Abschnitt befanden sich anders als in den Modellpeptiden **195** - **221** anstelle der beiden verbleibenden Glycine Aminosäuren mit raumbeanspruchenden Seitenketten. Die Verknüpfungen des Peptidthioesters H-KFSYLPFIPTRG-SR (**224**) mit dem MHC-II-Klasse Antigen Cysteinpeptid H-DYYDCRVEHWG-NH₂ (**222**) und des Helicase-Thioesterfragmentes Ac-YQQTGRAGRDG-SR (**225**) mit dem Peptid H-KHSDCLLFYNKS-NH₂ (**223**) konnten nicht durchgeführt werden. Auch konnte der Ablauf des Thiol-Thioester-Gleichgewichtes lediglich für die Reaktion der Fragmente **225** und **223** HPLC-analytisch durch das Vorliegen des entsprechenden Thioesterintermediates nachgewiesen werden. Die Verschiebung des Acylrestes hin zum *N*-Terminus erfolgte hingegen nicht.^[2] Vermutlich stellte hierbei der sterische Anspruch innerhalb des vor dem Cystein befindlichen Peptidabschnittes eine zu große Barriere für die Bildung des macrocyclischen Übergangszustandes dar. Ein effektive Aufeinandertreffen der α -Aminofunktion und der Thioesterstruktur setzt voraus, dass der *N*-Terminus des Peptides eine Schleifenkonformation einnimmt. Glycine zeigen hierbei eine höhere Flexibilität, denn die zulässigen Werte der ϕ - und ψ -Rotationswinkel haben einen erheblich größeren Umfang als bei anderen Aminosäuren der Fall.^[3] Daher könnte die Ausbildung der obligatorischen Schleifenkonformation auch dadurch blockiert worden sein, dass hierfür notwendi-

²Die Unterscheidung zwischen Umlagerungsprodukt und Thioesterintermediat erfolgte durch Hydrolyse. Nach Zugabe von Natronlauge (2 M) zum Ligationsansatz konnte das Intermediat mittels HPLC nicht mehr nachgewiesen werden.

³Die Winkel der Rotation um die C $_{\alpha}$ -C' und die N-C $_{\alpha}$ Bindung in Peptiden sind als ϕ und ψ definiert.

ge Rotationszustände durch die einzelnen Aminosäuren nicht eingenommen werden konnten.

4.3.5 Zusammenfassung

Sequenz-interne Cysteine haben einen beschleunigenden Einfluss auf thioesterbasierte Fragmentverknüpfungen. Nachdem durch eine Austauschreaktion ein Peptidacylfragment auf die Thiolseitenkette verlagert wurde, kann dieses zum *N*-Terminus hin verschoben werden. Hierfür ist die Bildung eines macrocyclischen Ringintermediates erforderlich und das *N*-terminal an das Cystein angrenzende Peptidsegment muss befähigt sein eine entsprechende Schleifenkonformation anzunehmen. Am besten geeignet sind Peptide in denen sich das Cystein auf Position 5 befindet. Hierbei konnten bei den Reaktionen der untersuchten Modellsysteme Ausbeuten erzielt werden, die das Verfahren als sinnvolle Alternative zur konventionellen cystein-basierten Ligation erscheinen lassen. Allerdings war es nicht möglich Peptidfragmente mit höherem sterischen Anspruchs mittels dieser Strategie zu verknüpfen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Die Aufklärung der Struktur und der biologische Funktionen von Peptiden und Proteinen rückte seit der Offenlegung einer unüberschaubaren Menge an Erbinformationen in besonderem Maße in den Fokus biomedizinischer Forschung. Neben der Isolation aus natürlichen Quellen und biotechnologischen Exprimierungsverfahren leistet die Peptidchemie hierbei einen beachtlichen Beitrag. Nicht zuletzt die Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese durch Merrifield [100] brachte erhebliche Erleichterungen für die Herstellung von Peptiden mit sich. Erst der dadurch geschaffene, schnellere Zugang zu Peptiden ermöglichte zahllose wissenschaftliche Erkenntnisse. Allerdings ist die Länge der mit dieser Methode zugänglichen Produkte beschränkt. Diese Begrenzung kann durch Anwendung konvergenter Ligationstrategien durchbrochen werden, die auf der Festphasensynthese aufbauen. Von besonderem Interesse ist die Ligation ungeschützter Peptidsegmente, die der zum Einsatz kommenden Kupplungsreaktion ein hohes Maß an Chemo Selektivität abverlangt. Das in diesem Zusammenhang am häufigsten angewendete Verfahren ist die native chemische Ligation, die die Synthese ganzer Proteine und Proteindomänen ermöglichte.[41, 59, 80] Bei dieser Methode reagieren ein Peptidthioester und ein Cysteinpeptid unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung miteinander.

Das seltene Auftreten von Cystein in Proteinsequenzen stellt ein Haupthemmnis für eine allgemeine Anwendbarkeit dar. Um dieser Beschränkung entgegen zu treten, wurden Verfahren entwickelt, die die Ausdehnung des Reaktionsprinzips der nativen chemischen Ligation auf andere Aminosäuren erlauben. In der so genannten erweiterten chemischen Ligation finden spaltbare Auxiliare Verwendung, deren Struktur das Cystein imitiert. Die Ligation-Entschwefelungs-Strategie basiert auf der Verwendung von β -Mercaptoaminosäuren zur Verknüpfung und einer späteren Entfernung des überschüssigen Schwefelatoms.[57] Die vorliegende Dissertation erweitert dieses Repertoire an Methoden zur cystein-unabhängigen Peptidfragmentkondensation.

Die Entwicklung basen-labiler Auxiliare für die erweiterte native chemische Ligation war ein Hauptschwerpunkt der Arbeit. Dabei stand das in Abbildung 5.1 gezeigte Konzept im Vordergrund. Der Elektronenakzeptorsubstituent des Auxiliars bewirkte hierbei die Induktion von α -C,H-Acidität. Dadurch konnte die Deprotonierung des benachbarten Kohlenstoffzentrums vollzogen werden, die eine E1_{cb}-Eliminierung initiierte. Im Verlauf dieser Reaktion konnte die Spaltung von

5.1 Zusammenfassung

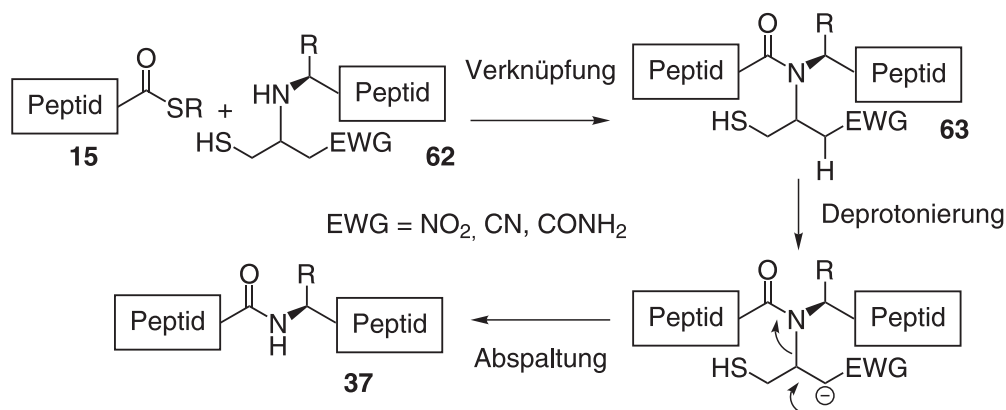


Abbildung 5.1: Prinzip der erweiterten nativen chemischen Ligation mit basen-labilen Auxiliären

Auxiliar und Peptid erfolgen.

Die zunächst zu bewältigte Herausforderung war die Bereitstellung eines geeigneten Synthesebausteines, der in der Festphasenpeptidsynthese verwendet werden konnte. Durch die Umsetzung der in Abbildung 5.2 gezeigten Syntheseroute konnte Glycin mit einem Nitrilauxiliar verknüpft und anschließend mit Schutzgruppen ausgestattet werden.

Bei Untersuchung des Monomers **118** als terminaler Baustein für die Festphasensynthese wurde bei Ablösung des Peptides vom polymeren Träger der Verlust des Auxiliärs festgestellt (Abb. 5.3 A). Die Erprobung des Glycinderivates **120** in einer Fmoc-on/off-Strategie lieferte ein gänzlich anderes Ergebnis. Nach Abspaltung des noch Fmoc-blockierten Nitrilauxiliarpeptides stellte sich heraus, dass die Nitrilfunktion dem nucleophilen Angriff durch die benachbarte Thiofunktion unterlag. Dabei entstanden unerwartet eine Butyramid- und eine Thiolactonauxiliarspezies (Abb. 5.3 B; **134** bzw. **135**).

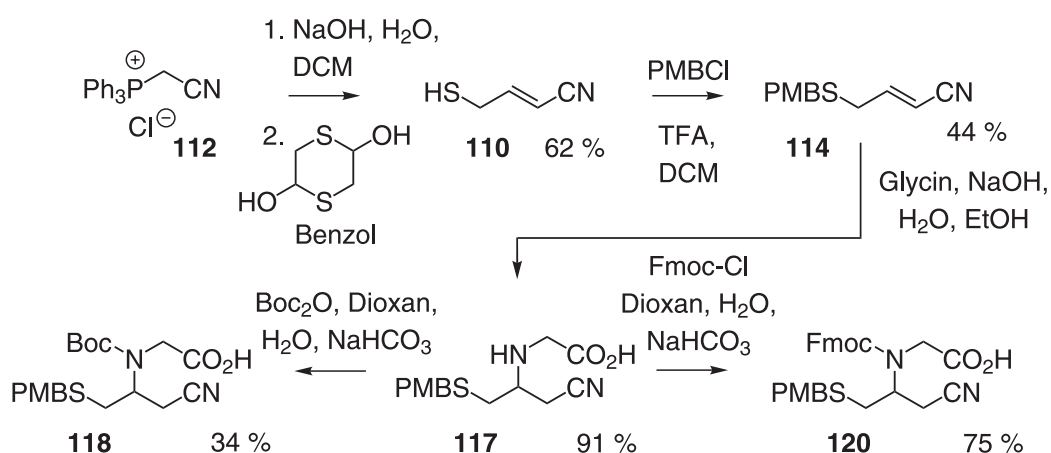


Abbildung 5.2: Synthese von Monomeren für die cystein-unabhängige Ligation mit einem basen-labilen Auxiliär

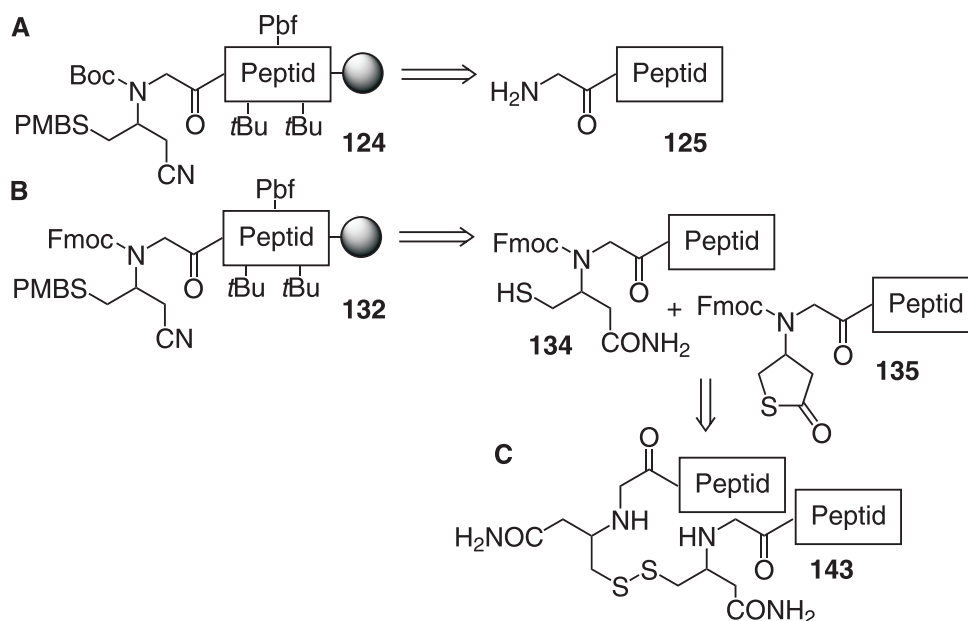


Abbildung 5.3: Synthese von Modellpeptiden für cystein-unabhängige Ligation mit basen-labilem Auxiliar. **A:** Bei Verwendung des *N*-Boc-geschützten Monomers **118** wurde bei der Abspaltung vom polymeren Träger der Verlust des Auxiliars beobachtet. **B:** Fmoc-on/off-Strategie mit Fmoc-Nag(PMB)-OH **120**. Nach der Deblockierung der Auxiliarthiolfunktion erfolgt ein nucleophiler Angriff auf das benachbarte Nitril. Als Resultat werden das Butyramidauxiliarpeptid **134** und die Thiolactonspezies **135** gebildet. **C:** Als Startmaterial für eine Ligrationsreaktion wurde das Peptiddisulfid **143** durch Oxidation von **134** mit Luftsauerstoff hergestellt.

Durch die Verwendung eines als Disulfid geschützten Monomers konnte unter Beibehaltung der Fmoc-on/off-Strategie ein Modellpeptid hergestellt werden, dessen Nitrilauxiliar keinen Veränderungen unterlag. Nach der Fmoc-Abspaltung in Lösung wurde das Verhalten unter den Bedingungen der Ligation untersucht. Dabei erfolgte jedoch wiederum eine Abspaltung des Auxiliars unter Bildung von **125**. Somit wurde gezeigt, dass eine Nitrilgruppe als elektronenziehender Substituent für ein basen-labiles Auxiliar nach dem untersuchten Konzept ungeeignet war. Die primäre Amidfunktion in **134** wies geringere Elektronenakzeptoreigenschaften auf und es war zu erwarten, dass eine spontane Abspaltung dieser Gruppe nicht stattfinden würde. Die Experimente wurden aufgrund dessen mit dem Butyramidauxiliarpeptid **134** fortgesetzt. Vor Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die Thiolfunktion jedoch zunächst unter Einfluss von Luftsauerstoff in ein symmetrisches Disulfid überführt (Abb. 5.3 C).

Das Disulfid **143** konnte erfolgreich für eine Peptidverknüpfungsreaktion mit dem Modellpeptidthioester **140** verwendet werden (Abb. 5.4). Das primäre Ligrationsprodukt der Reaktion **146** unterlag dabei einer reversiblen Oxidation, wobei

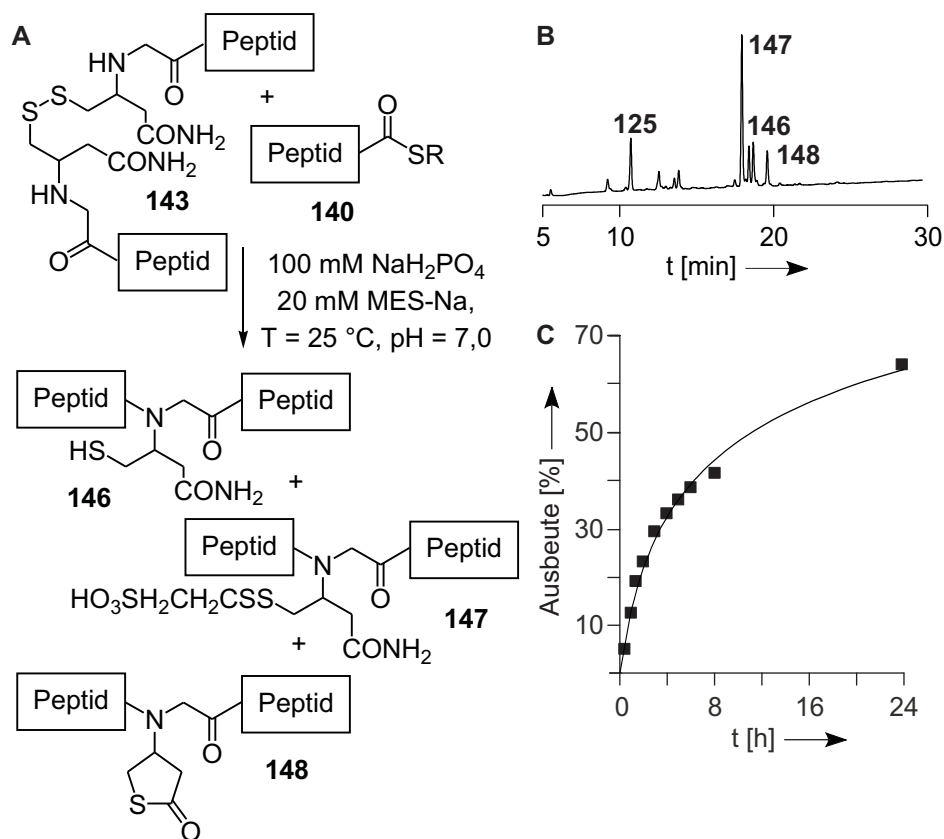


Abbildung 5.4: Cystein-unabhängige Ligation mit basen-labilem Auxiliär. Das Peptiddisulfid **143** wurde mit dem Thioester **140** umgesetzt. Als primäres Ligrationsprodukt entstand **146**. Durch Oxidation wurde daraus das gemischte Disulfid **147**. Eine weitere Folgereaktion war die Cyclisierung des Butyramides **146** zum Thiolacton **148**. HPLC-Gradient 1, $\lambda = 220$ nm.

mit dem Thioladditiv Mercaptoethansulfonsäure das gemischte Disulfid **147** gebildet wurde. Eine weitere Folgereaktion war die Cyclisierung des Butyramidauxiliars in **146** zum Thiolacton in **148**.

Für die Abspaltung des Auxiliars wurden das Auxiliärpeptid **147** und das Thiolactonpeptid **148** bei 80 °C und einem pH-Wert von 9,5 inkubiert. Die Reaktion erfolgte unter reduktiven Bedingungen, da die Abspaltung des oxidierten Auxiliars in **147** nicht gelang. Die Abspaltung des Thiolactones von **148** verlief mit einer höheren Ausbeute schneller als die Spaltung von **147**, die zudem durch Bildung von Nebenprodukten begleitet wurde. Die α -C,H-Acidität des Amides in **147** war erheblich geringer als die α -C,H-Acidität des Thiolactones in **148** und daher war zu erwarten, dass nur das Thiolacton nicht aber das acyclische Butyramid vom Peptidrückgrat abgespalten werden konnte. Diese Annahme wurde durch den experimentellen Befund gestützt (Abb. 5.5). Danach musste zunächst die Cyclisierung des Mercaptobutyramides in **147** zum Thiolacton in **148** erfolgen,

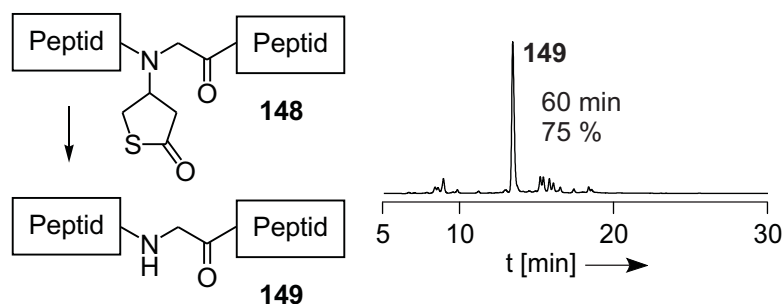


Abbildung 5.5: Abspaltung des basen-labilen Auxiliars. Die Ablösung der Auxiliargruppe wurde ausgehend vom unsymmetrischen Disulfid **147** (**B**) und dem Thiolactonpeptid **148** (**A**) untersucht. Die Reaktion des Thiolactons **148** verlief schneller und mit einer besserer Ausbeute als die Umsetzung von **147**, bei der zudem mehr Nebenprodukte gebildet wurden. Reaktionsbedingungen: 100 mM Glycin/NaOH, 25 mM TCEP, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 9,0$; HPLC-Gradient 2, $\lambda = 220\text{ nm}$.

bevor dieser cyclische Thioester dann vom Peptid abgelöst werden konnte.

Die Ligations-Entschwefelungs-Strategie war ein weiterer Schwerpunkt der Dissertation. Die Überführung von Cystein in konventionellen Ligationsprodukten in Alanin wurde bereits 2001 durch Dawson *et al.* beschrieben.[144] Auch eine Ligation mit Phenylalanin durch Verwendung eines entsprechend synthetisierten β -Mercaptophenylalanins war bereits bekannt.[18, 38] Im Rahmen der Dissertation konnte kommerziell verfügbares Penicillamin (in **65**, Abb. 5.6) als Vorläufer von Valin (in **67**, Abb. 5.6) in Ligationsreaktionen verwendet werden.[56]

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten zum Teil sehr guten Ausbeuten erzielt werden. Von großer Bedeutung war der Einsatz von Thiophenol als

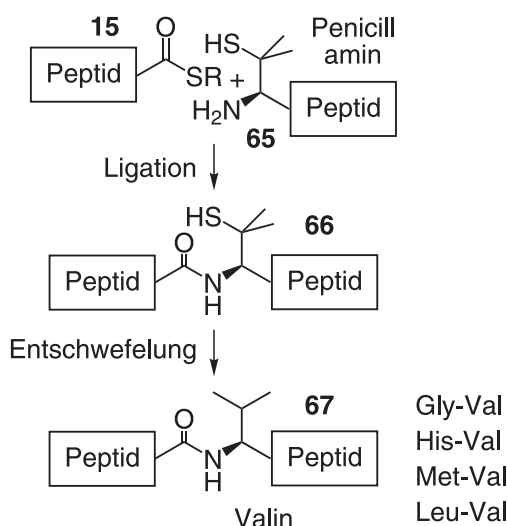


Abbildung 5.6: Ligations-Entschwefelungs-Strategie mit Penicillamin.

alleinigem Thioladditiv und die wiederholte Zugabe von Triscarboxyethylenphosphan zur Reduktion unreaktiver Disulfide. Dadurch konnte sogar die Erschließung der sterisch anspruchsvollen Leucin-Valin-Bindung demonstriert werden. Die Entschwefelung der Ligationsprodukte erfolgte zum Teil vermittelt metall-basierter Bedingungen mit moderaten Ausbeuten. Erheblich bessere Ergebnisse konnten durch die Anwendung metall-freier Bedingungen nach deren Optimierung erzielt werden.[141] Dazu wurden die Penicillaminpeptide einer Radikalreaktion unterworfen, bei der ein wasserlöslicher Radikalstarter und das in der Peptid- und Proteinchemie allgegenwärtige Triscarboxyethylenphosphan als Reduktionsmittel eingesetzt wurden. Als Wasserstoffdonor wurden nicht Ethyl- bzw. *tert*-Butylmercaptan sondern das geruchsneutrale und effektivere Glutathion eingesetzt. Dadurch waren nebenproduktsfreie Umsetzungen mit bis zu sehr guten Ausbeuten möglich.

Im letzten Teil der Dissertation wurde der Einfluss interner Cysteine auf die thioester-basierte Peptidfragmentverknüpfung untersucht (Abb. 5.7). Analog zur nativen chemischen Ligation, in der *N*-terminale Cysteine eine reversible Thioaustauschreaktion eingehen, sind auch Cysteinreste innerhalb einer Peptidsequenz dazu befähigt ein Thiol-Thioester-Gleichgewicht zu bedienen. Allerdings kann kein *S*→*N*-Acyltransfer über eine optimale 5-gliedrige Zwischenstufe erfolgen, sondern es ist nur eine Verschiebung des Acylrestes zum *N*-Terminus des Peptides durch Ausbildung eines macrocyclischen Ringintermediates möglich. Zur Untersuchung dieser These wurden Reihen homologer Peptide mit variierender Cysteinposition synthetisiert und auf ihre Fähigkeit zur Bildung einer solchen macrocyclischen Zwischenstufe hin untersucht. Ein Vergleich der Mengen der vollständig umgelagerten Ligationsprodukte verdeutlichte, dass Peptide mit einem internen Cystein in Position 5 hierfür mit Abstand am besten geeignet sind. Die Bildung der Verknüpfungsprodukte wurde aber im Falle von Peptiden mit *N*-terminalem Glycin durch eine direkte Aminolyse des Thioesterpeptides beeinflusst. Dieser alternative Reaktionspfad konnte durch eine Erhöhung des sterischen Anspruchs an den *N*-Termini der Cysteinpeptide ausgeschlossen werden. Danach konnten bei einer Gegenüberstellung der cystein-haltigen Peptide mit einem Kontrollpeptid ohne Cystein bis zu 25fache Beschleunigungen der anfänglichen Reaktionsraten beobachtet werden.[58]

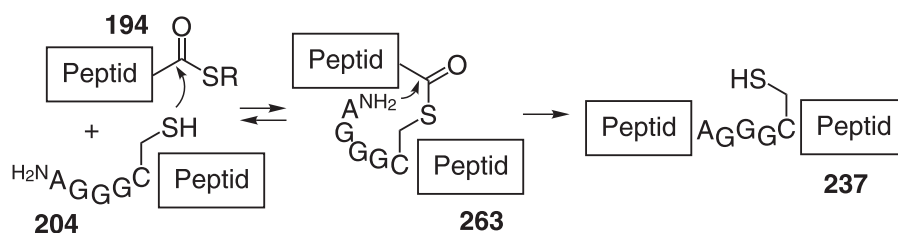


Abbildung 5.7: Ligation mit internem Cystein. Zunächst wird der interne Cysteinrest des Peptides **204** Bestandteil eines Thiol-Thioester-Gleichgewichtes. Die Übertragung des Acylrestes zum *N*-Terminus innerhalb des Peptides **263** erfordert die Bildung eines macrocyclischen Intermediates.

5.2 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden die Grundlagen für die erweiterte native chemische Ligation mit basen-labilen Auxiliaren geschaffen. Anders als bei bereits bekannten Systemen gelingt die Abspaltung unter vergleichsweise milden Bedingungen, die mit erheblich mehr post-translationalen Modifikationen kompatibel sein werden. So ist bis jetzt die Synthese eines phosphorylierten Peptides mit Hilfe der cystein-unabhängigen, auxiliar-vermittelten Ligation bisher nicht beschrieben worden.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Modellreaktionen könnten durch den Einsatz effektiverer Thioladditive wie etwa Thiophenol erheblich rascher verlaufen und dadurch die Ligation mit sterisch anspruchsvolleren Thioestern ermöglicht werden. Eine Reaktionsführung unter reduktiven Bedingungen ließe die für Abspaltung der Auxiliargruppe wichtige Thiolactonspezies zum einem Hauptprodukt werden. Dadurch könnte die Ligations-Abspaltungs-Sequenz insgesamt erheblich beschleunigt werden, da eine Spaltung des Auxiliars vom Peptid direkt im Ligationspuffer durch eine simple Anhebung von pH-Wert und Inkubationstemperatur möglich würde.

Für eine konsequente Weiterentwicklung muss jedoch zuvor die Synthese der Amidauxiliaraminosäurebausteine optimiert werden. Einen Ansatz hierfür bietet die TFA-vermittelte Spaltung der PMB-Thioetherschutzgruppe des Nitrilauxiliarglycines, die simultan die Umwandlung in ein Butyramid- bzw. ein Butyrothiolactonsystem bewirkte (siehe Abb. 4.20). In einem Folgeschritt müsste die Blockierung der frei gelegten Thiolfunktion als Disulfid erfolgen. Würde dabei Ammoniak zugegeben, so könnte auch die Thiolactonspezies in den gewünschten Festphasensynthesebaustein überführt werden. Vermittels dieser Modifikationen sollte mit der in dieser Arbeit vorgestellten Synthesestrategie ebenfalls die Bereitstellung eines Alanin-Monomers möglich sein, mit dem die Untersuchung der Ligation sterisch anspruchsvollerer Verknüpfungsstellen erfolgen könnte. Es könnten aber auch Elektronenakzeptorsubstituenten Verwendung finden, die gegenüber eines Angriffs der benachbarten Auxiliarthiolfunktion inert sind. Eine *p*-Nitrophenylgruppe beispielsweise würde die Abspaltung, die vermittelt einer $E1_{cb}$ -Eliminierung verläuft, durch Ausbildung eines konjugierten Styrolsystems unterstützen und wäre gegen einen Angriff des Thiols unempfindlich.

Muir *et al.* verwendeten ein photo-labiles Auxiliar des Phenethyltyps für die Ligation eines exprimierten Thioesters des verstärkt grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) mit dem Texas Rot-Farbstoff bzw. mit einem Lipidanker. Nach Microinjection konnte *in vivo* durch Photolyse das eGFP-Texas Rot-FRET-System aufgelöst werden. Die Bestrahlung des eGFP-Lipid-Konjugates bewirkte die Aufhebung dessen Membranlokalisierung.[113] Ähnliche Anwendungen sind mit dem Butyramidauxiliar denkbar. Dabei stünde nicht die erweiterte native chemische Ligation im Vordergrund, sondern die Bildung der Thiolactonstruktur. Die primäre Amidfunktion der Butyramidauxiliargruppe dient hierbei als Anknüpfungspunkt für Zielmoleküle die durch den Angriff der benachbarten Thiolfunktion wie-

5.2 Ausblick

der freigesetzt werden können. Um die Austrittstendenz des Amins zu steigern, könnten zwischen das eigentliche Zielmolekül und das Auxiliar elektronenziehende Strukturelemente eingefügt werden. Eine potentielle Anwendung dieser neuartigen Strategie wäre das Schleusen von Wirkstoffmoleküle durch biologische Membranen mit Hilfe zell-penetrierender Peptide. Die Thiolfunktion des Auxiliars sollte dabei als Disulfid geschützt sein, dass erst unter den im Allgemeinen in Zellen vorherrschenden reduktiven Bedingungen gespalten wird. Somit würde sichergestellt sein, dass der Wirkstoff seinen Bestimmungsort in der Zelle erreicht und erst dort zeit-kontrolliert nach und nach freigesetzt wird.

6 Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

6.1.1 Chemikalien

Fmoc/tBu-Aminosäuren wurden von Senn Chemicals oder NEO-Mps erworben. Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Boc-Pen(Trt)-OH und Fmoc-Pen(Trt)-OH wurden von Novabiochem oder BACHEM bezogen. Die Bezugsquelle der Boc/Bzl-Aminosäuren war NEO-Mps. Die zur Peptidsynthese verwendeten Lösungsmittel (DMF, NMP, TFA) wurden in „Peptide Synthesis Grade“-Qualität erworben. Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros, AldrichTriplet, Fluka, Iris-Biotech, Lancaster oder Merck erworben und, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für sämtliche wässrige Lösungen wurde Wasser der Qualitätsstufe Milli-Q-Pore verwendet. Zur Wasseraufbereitung wurde eine Millipore-Anlage der Fa. Membrapure verwendet. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch gegebenenfalls destilliert bzw. nach Standardmethoden getrocknet. Absolutes DMF ($\text{H}_2\text{O} < 0,01 \%$) wurde von Fluka bezogen und über Molekularsieb gelagert.

6.1.2 Dünnschichtchromatographie

Für das Verfolgen von Reaktionsverläufen kamen Dünnschichtchromatographie-Platten der Firma Merck (Kieselgel 60 F254) zum Einsatz. Zur Detektion der Substanzen diente UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$, sowie Ninhydrinlösung (300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure, 997 ml MeOH) oder Seebach-Reagenz (3 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 5 g Molybdophosphorsäure, 16 ml H_2SO_4 (konzentriert), 184 ml H_2O).

6.1.3 Kernresonanzspektroskopie

Die Messungen von ^1H -, ^{13}C -, DEPT-, APT-, HH-COSY-, HMQC- und HMBC-NMR-Spektren erfolgten mit einem Bruker DPX 300 Gerät. NMR Spektren wurden in CDCl_3 , CD_3OD und DMSO-d_6 aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. Die Kalibrierung der ^1H -, ^{13}C - sowie der Kopplungsspektren erfolgte an den charakteristischen Signalen der Lösungsmittel CDCl_3 (^{13}C : Triplett, 77,0 ppm; ^1H : Singulett, 7,26 ppm), CD_3OD (^{13}C : Septuplett, 49,05 ppm; ^1H : Singulett, 4,84 ppm) und DMSO-d_6 (^{13}C : Septuplet, 39,43 ppm; ^1H : Quintuplet, 2,50 ppm). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Bei der Beschreibung der Signalmultiplizität wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quatruplett und m = Multiplett.

6.1.4 Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren wurden an einem *GCMS 5995-A* Spektrometer der Firma *Hewlett-Packard* gemessen. Die Ionisierung erfolgte per Elektrosprayionisation.

6.1.5 Flash-Säulenchromatographie

Trennungen durch Flash-Säulenchromatographie wurden mit dem *SepacoreTM*-Flash-System der Firma *Büchi* durchgeführt. Die zum Gerät gehörenden Polypropylen-Leerkartuschen ($\varnothing 40$ mm, $l = 150$ mm) wurden mit 90 g Kieselgel 60 (0,063 – 0,200 mm) der Firma *Merck* gefüllt. Die Detektion erfolgte mit einem online-UV-Monitor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm. Es kamen lineare Gradienten zum Einsatz, wobei mit dem unpolareren Lösungsmittel begonnen wurde und der Anteil des polaren Lösungsmittel dann über einen Zeitraum von 40 min bei einer Flussrate von $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ gesteigert wurde. Als mobile Phase wurden, falls nicht explizit anders angegeben, die bei der dünnschichtchromatographischen Ermittlung des R_f -Wertes verwendeten Lösungsmittel genutzt.

6.1.6 Semi-präparative und präparative HPLC

Zur Aufreinigung der Verbindungen wurde ein *1100* HPLC-System der Firma *Agilent* verwendet. Für semi-präparative Trennungen diente als Trennsäule eine semi-präparative RP-C18 HPLC-Säule der Firma *Varian* (*Polaris C18 A 5 μ 250 \times 100* (Porengröße 220 Å)). Für präparative Trennungen diente als Trennsäule eine *Nucleodur Gravity C18 A 5 μ (VP 250/21*, Porengröße: 110 Å) der Firma *Macherey&Nagel*. Zur Detektion der Signale diente ein Multiwellenlängen-Detektor bei den Wellenlängen $\lambda = 210$ nm (unmarkierte Peptide), $\lambda = 280$ nm (Tyrosin und/oder Tryptophan-beihaltende Peptide). Zur Elution wurde ein binäres Gemisch der Eluenten A (Wasser; 1 % Acetonitril; 0,1 % TFA) und B (Acetonitril; 1 % Wasser; 0,1 % TFA) bei einer Flussrate von $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (semi-präparativ) bzw. $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (präparativ) verwendet.

6.1.7 Analytische HPLC

Für die analytische HPLC wurde ein Gerät der Serie *Elite LaChrom* der Firma *Merck Hitachi* verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines Dioden-Array-Detektors bei einer Wellenlänge von $\lambda = 222$ nm oder $\lambda = 280$ nm. Als Trennsäule diente eine auf 55 °C temperierte *Polaris C18 A 5 μ 250 \times 046* (Porengröße: 220 Å) der Firma *Varian*. Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch aus

A (98,9 % Wasser, 1 % Acetonitril, 0,1 % TFA) und B (98,9 % Acetonitril, 1 % Wasser, 0,1 % TFA) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

- Gradient 1:** von 3 % B auf 20 % B in 30 min
- Gradient 2:** von 3 % B auf 30 % B in 30 min
- Gradient 3:** von 3 % B auf 60 % B in 30 min
- Gradient 4:** von 3 % B auf 30 % B in 20 min
- Gradient 5:** von 10 % B auf 80 % B in 20 min

6.1.8 Analytische HPLC-MS

Ein Gerät der Serie *1100* der Firma *Agilent* in Kombination mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer kam für die analytische HPLC-MS-Messungen zum Einsatz. Die Detektion erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210$ nm. Als Trennsäule fungierte eine auf 55 °C temperierte *Polaris C18 A 5 μ 250x046* (Porengröße: 220 Å) der Firma *Varian*. Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch aus A (98,9 % Wasser; 1 % Acetonitril; 0,1 % Ameisensäure) und B (98,9 % Acetonitril; 1 % Wasser; 0,1 % Ameisensäure) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

- Gradient 6:** von 3 % B auf 20 % B in 20 min
- Gradient 7:** von 3 % B auf 30 % B in 20 min
- Gradient 8:** von 3 % B auf 60 % B in 20 min
- Gradient 9:** von 3 % B auf 80 % B in 20 min
- Gradient 10:** von 10 % B auf 80 % B in 20 min

6.1.9 Analytische UPLC-MS

Ein *Aquity* UPLC-System der Firma *Waters* in Kombination mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer kam für die analytische UPLC-MS-Messungen zu Einsatz. Die Detektion erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Als Trennsäule fungierte eine auf 55 °C temperierte *BEH 130 C18 1,7 μ m 50/2,1* der Firma *Waters*. Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch aus A (98,9 % Wasser; 1 % Acetonitril; 0,1 % Ameisensäure) und B (98,9 % Acetonitril; 1 % Wasser; 0,1 % Ameisensäure) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

- Gradient 11:** von 1 % B auf 5 % B in 6 min

6.1.10 MALDI/TOF-Massenspektrometrie

Zur Messung der MALDI-TOF-Massenspektren wurde eine *Voyager DETM Biospectrometry Workstation* der Fa. *PerSeptive Biosystems* verwendet. Als Messmethode dienten folgende Einstellungen: Beschleunigungsspannung 20.000 V, Grid 95 %, Guide Wire 0,05 %, Delay Time 100 nsec. Zur Anregung wurde ein Stickstoff-UV-Laser der Wellenlänge $\lambda = 337$ nm eingesetzt. Als Matrix wurde entweder eine 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) in Wasser:Acetonitril (50:50) mit 0,1 % TFA verwendet. Die externe Kalibrierung wurde mit Hilfe eines *Sequazyme* Peptid-Massen-Standards-Kit der Fa. *Applied Biosystems* durchgeführt. Als Kalibrierungssubstanzen dienten Angiotensin I (1297,51 Da), ACTH (clip 1–17; 2094,46 Da), ACTH (clip 18–39; 2466,72 Da), ACTH (clip 7–38, 3660,19 Da) und Insulin (bovin, 5734,59 Da).

6.1.11 UV-Spektroskopie

Es wurde ein *Carey 100 Bio* Spektrometer der Firma *Varian* verwendet.

UV-spektrometrische Bestimmung des Beladungsgrades von Fmoc-beladenen Harzen

Zur Bestimmung des Beladungsgrades wurden 2 - 3 mg Harz mit 1 ml DMF/Piperidin (4:1) versetzt und fünf Minuten geschüttelt. Die überstehende Lösung wurde verdünnt und die Konzentration des Fulven-Piperidin-Adduktes bei einer Wellenlänge von $\lambda = 300$ nm ($\varepsilon_{300} = 7800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bestimmt.

Bestimmung von Peptidkonzentrationen / Syntheseausbeuten

Konzentrationen von Peptiden wurden in Phosphatpuffer (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM NaH_2PO_4 , pH = 7,0) bestimmt. Der Extinktionskoeffizient (ε_{280}) wurde mit Hilfe des PROTEIN CALCULATOR v3.3 bestimmt.[115]

6.2 Allgemeine Arbeits- und Synthesevorschriften

6.2.1 Harzbeladung

Beladung von Wang-Harz

Wang-Harz (100 - 200 mesh; $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) (etwa 100 mg) wurde in DMF (2 ml) für 30 Minuten geschüttelt und dann gewaschen ($5 \times$ DMF, $5 \times$ CH_2Cl_2 , $5 \times$ DMF; je 1,5 ml). Der Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (1 mmol) wurde in CH_2Cl_2 gelöst, diese Lösung mit Diisopropylcarbodiimid (0,5 mmol) versetzt und die Lösung für 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in DMF wieder aufgelöst und diese Lösung dann mit dem

gequollenen Wang-Harz vermischt. Weiterhin wurde DMAP (0,01 mmol) in DMF (0,1 ml) gelöst und ebenfalls mit dem Harz vermischt. Nach 2 Stunden Schütteln wurde das Harz gewaschen (5× DMF, 5× CH₂Cl₂, 5× DMF; je 1,5 ml) und das Harz dann für 15 Minuten mit Pyridin/Ac₂O (4:1) behandelt. Nach erneutem Waschen (5× DMF, 10× CH₂Cl₂; je 1,5 ml) wurde das Harz unter vermindertem Druck von Lösungsmittelresten befreit. Die Ermittlung des Beladungsgrades wurde anhand der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe UV-spektrometrisch bestimmt.

Beladung von *Novasyn*-TGR-Harz

Die Beladung des TGR-Harzes (90 µm beads; 0,2 - 0,3 mmol·g⁻¹) wurde nicht als separate Operation durchgeführt, sondern erfolgte als erster Schritt der automatisierten Festphasenpeptidsynthese.

Beladung von MBHA-Harz SS

MBHA-Harz (100 - 200 *mesh*; 0,8 mmol·g⁻¹) (etwa 100 mg) wurde in DMF (2 ml) für eine Stunde geschüttelt und im Anschluss 2x 10 Minuten mit CH₂Cl₂/DIPEA (95:5; 2 ml) geschüttelt. Im Anschluss wurde gewaschen (5× DMF, 5× CH₂Cl₂, 5× DMF; je 1,5 ml) und das Harz dann für 5 Stunden mit der Kupplungslösung (150 µmol Fmoc-Gly-OH, 150 µmol PyBOP und 450 µmol NMM in 2 ml DMF) geschüttelt. Danach wurde gewaschen (5× DMF, 5× CH₂Cl₂, 5× DMF; je 1,5 ml) und das Harz dann für 15 Minuten mit Pyridin/Ac₂O (4:1) behandelt. Nach erneutem Waschen (5× DMF, 10× CH₂Cl₂; je 1,5 ml) wurde das Harz unter vermindertem Druck von Lösungsmittelresten befreit. Die Ermittlung des Beladungsgrades wurde anhand der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe UV-spektrometrisch bestimmt.

Beladung von 4-Sulfamylbutyryl AM Harz

4-Sulfamylbutyryl-Harz (200 - 400 *mesh*; 1,1 mmol·g⁻¹) (etwa 100 mg) wurden in DMF (2 ml) für 1 Stunden geschüttelt und dann gewaschen (5× DMF, 5× CH₂Cl₂, 5× DMF; je 1,5 ml). Danach wurde das Harz mit der Kupplungslösung (75 µmol Fmoc-Gly-OH, 75 µmol PyBOP und 225 µmol DIPEA in 1,5 ml DMF) vermischt und für 4 Stunden geschüttelt. Danach wurde erneut gewaschen (5× DMF, 5× CH₂Cl₂, 5× DMF; je 1,5 ml) und das Harz dann für 15 Minuten mit Pyridin/Ac₂O (4:1) behandelt. Nach erneutem Waschen (5× DMF, 10× CH₂Cl₂; je 1,5 ml) wurde das Harz unter vermindertem Druck von Lösungsmittelresten befreit. Die Ermittlung des Beladungsgrades wurde anhand der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe UV-spektrometrisch bestimmt.

6.2.2 Manuelle Peptidfestphasensynthese

Protokoll zur manuellen Peptidsynthese nach Fmoc/*t*Bu-Strategie

Je nach gewünschtem Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge an Harz in einen Reaktor überführt. Das Harz wurde 30 min in DMF (1 ml) geschüttelt und anschließend gewaschen (je 1 ml: 5x DMF).

6.2 Allgemeine Arbeits- und Synthesevorschriften

Fmoc-Abspaltung: Das Harz wurde 10 min mit Piperidin/DMF (1:4) geschüttelt und anschließend 3x mit DMF, 3x mit DCM und 3x mit DMF gewaschen.

Kupplung: Zur Voraktivierung wurden 4 äq. der entsprechenden Aminosäure (Konzentration 0,1 M), 8 äq. NMM, 3,6 äq. TCTU in DMF 2 min geschüttelt und anschließend mit dem Harz gemischt. Nach 45 min Inkubation wurde das Harz 3x mit DMF, 3x mit DCM und 3x mit DMF gewaschen.

Capping: Nach 1x 2min Schütteln mit einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin (2:3) wurde das Harz 3x mit DMF, 3x mit DCM und 3x mit DMF gewaschen.

Freisetzung vom Harz: Zunächst wurde das Harz mit DMF (3x) und DCM (10x) gewaschen. Anschließend wurde über den angegebenen Zeitraum mit TFA/TES/Thioanisol (92:4:4, 1 ml) geschüttelt und anschließend 2x mit TFA (je 0,2 ml) extrahiert.

Aufarbeitung: Die vereinigten TFA-Phasen wurden im Vacuum auf ca. 0,1 ml eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe von Diethylether (1 ml) gefällt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde erneut in TFA (150 μ l) gelöst und mit Diethylether gefällt. Dieser Vorgang wurde 2-3mal wiederholt. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung von CH₃CN (1 %) und TFA (0,1 %) in H₂O (1 ml) aufgenommen und zentrifugiert. Die wässrige Lösung wurde mittels analytischer RP-HPLC und/oder MALDI analysiert und im Anschluss mit Hilfe präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden in der Speed-Vac vom Hauptteil des Eluenten befreit und anschließend lyophilisiert.

Protokoll zur manuellen Peptidsynthese nach Boc/Z-Strategie

Je nach gewünschtem Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge MBHA-Harz in einen Reaktor überführt. Das Harz wurde 2x mit 5% DIPEA/DCM 30 min geschüttelt und anschließend gewaschen (je 1 ml: 5x DMF, 10x CH₂Cl₂).

Boc-Abspaltung: Nach 5 min Schütteln in TFA/*m*-Kresol (95:5, v/v, 1 ml) wurde das Harz gewaschen (je 1 ml: 10x CH₂Cl₂, 5x DMF).

Kupplung: Das Harz wurde mit 4 äq. des Bausteins (Endkonzentration ca. 0,1 M in DMF), 4 äq. PyBOP und 8 äq. NMM umgesetzt. Nach 1 h Schütteln wurde das Harz gewaschen (je 1 ml: 5x DMF, 5x CH₂Cl₂, 5x DMF).

Capping: Nach 5 min Schütteln in Pyridin/Ac₂O (3:2, 1 ml) wurde das Harz gewaschen (je 1 ml: 5x DMF, 10x CH₂Cl₂).

Freisetzung vom Harz: Das Harz wurde mit TFA/TFMSA/TA/EDT (77:10:10:3, v/v/v/v, 0,7 ml) für 1,5 h geschüttelt und anschließend 2x mit TFA (je 0,2 ml) extrahiert.

Aufarbeitung: Die vereinigten TFA-Phasen wurden im Vacuum auf ca. 0,2 ml eingengt. Das Rohprodukt wurde dann durch Zugabe von Diethylether (1 ml) gefällt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde erneut in TFA (150 μ l) gelöst und mit Diethylether gefällt. Dieser Vorgang wurde 2-3 mal wiederholt. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung von CH₃CN (1%) und TFA (0,1 %) in H₂O (1 ml) aufgenommen und zentrifugiert. Die wässrige Lösung wurde mittels analytischer RP-HPLC und/oder MALDI analysiert und im Anschluss mit

Hilfe präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden in der Speed-Vac vom Hauptteil des Eluenten befreit und anschließend lyophilisiert.

6.2.3 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Automatisierte Festphasensynthese nach Fmoc/*t*Bu-Strategie wurde im 5 μ mol und 10 μ mol Maßstab durchgeführt. Die Menge der Reagenzien im beschriebenen Protokoll entspricht dem 5 μ mol Maßstab.

Fmoc-Abspaltung: Zu dem Harz wurde DMF/Piperidin (4:1, 300 μ l) pipettiert. Nach 2 Minuten wurde diese Prozedur wiederholt und das Harz dann nach Ablauf von 2 Minuten gewaschen (DMF; 2x 320 μ l, 3x 250 μ l, 2x 200 μ l).

Kupplung: Ein Reaktionsgefäß wurde zur Aktivierung des Aminosäurebausteines mit einer TCTU-Lösung (0,5 M) in DMF (5,4 äq. entsprechend der Beladung des Harzes), einer NMM-Lösung (4 M; 12 äq.) und einer Lösung des Aminosäurederivates (0,4 M; 6 äq.) in NMP befüllt. Nach 2 Minuten wurde die resultierende Lösung zum Harz pipettiert. Nach 30 Minuten wurde das Harz gewaschen (DMF; 2x 200 μ l).

Capping: Es erfolgte die Zugabe von Ac₂O/2,6-Lutidin/DMF (5:6:89, v/v/v, 200 μ l). Nach 2 Minuten wurde das Harz gewaschen (DMF; 3x 200 μ l). Am Ende des Sequenzaufbaus wurde das Harz abschließend gewaschen (DMF; 2x 600 μ l, 3x 500 μ l, 2x 400 μ l; EtOH 3x 400 μ l).

Peptidsäuren und -amide

Freisetzung vom Harz: Das Harz wurde gewaschen (10x 1 ml CH₂Cl₂) und dann mit einem Gemisch aus TFA/ Thioanisol/TIS/H₂O (92:3:3:2, v/v/v/v, 1 ml) behandelt. Nach 2 Stunden wurde das Harz mit TFA extrahiert (2x 500 μ l) und die vereinigten TFA-Lösungen dann unter vermindertem Druck bis zu einem Volumen von ungefähr 300 μ l aufkonzentriert. Die Präzipitation des Peptides wurde dann durch Zugabe von kaltem Diethylether induziert. Das Rohprodukt wurde in entgastem Wasser gelöst, um der Oxidation von Methioninresten und der Bildung von Disulfiden vorzubeugen, danach mittels HPLC und MALDI-TOF/MS analysiert und mit Hilfe präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden in der Speed-Vac vom Hauptteil des Eluenten befreit und anschließend lyophilisiert.

Peptidthioester

Freisetzung von Harz: Das Harz wurde gewaschen (10x 1 ml CH₂Cl₂; 10 x 1 ml THF (wasserfrei)) und zur Aktivierung der Sulfonamidbindung mit Trimethylsilyldiazomethanol-Lösung (2 M in THF; 200facher Überschuss gegenüber Harzbeladung) für 2 Stunden behandelt. Danach wurde gewaschen (je 1 ml: 10x CH₂Cl₂, 5x DMF) und das Harz einer Lösung von Ethanthiol (50 äq.) oder Benzylmercaptopan (50 äq.) und Natriumthiophenolat (3 äq.) in DMF behandelt. Nach 8 Stunden wurde die Lösung aufgefangen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde dann für 2 Stunden mit einem Gemisch von TFA:*m*-Kresol:H₂O:EDT:TES (85:5:5:2,5:2,5, v/v/v/v/v, 1 ml) behandelt. Das

6.2 Allgemeine Arbeits- und Synthesevorschriften

Volumen der Deblockierungslösung wurde unter vermindertem Druck reduziert und das Ausfallen des Rohproduktes durch die Zugabe von kaltem Diethylether induziert. Das Rohprodukt wurde in entgastem Wasser gelöst, um der Oxidation von Methioninresten und der Bildung von Disulfiden vorzubeugen, danach mittels HPLC und MALDI-TOF/MS analysiert und mit Hilfe präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden in der Speed-Vac vom Hauptteil des Eluenten befreit und anschließend lyophilisiert.

6.2.4 Puffer

Die festen Bestandteile wurden in einem Schlenk-Kolben in Wasser gelöst. Vor der Zugabe von TCEP wurden die Lösungen durch Anlegen von Vakuum entgast. Die Einstellung des pH-Wert erfolgte mit Natronlauge (2 M). Die Pufferlösungen wurden bei -20 °C gelagert und vor der Benutzung unter leichtem Argon-Gegendruck aufgetaut. Thiophenol wurde erst nach dem Lösen der Peptidfragmente zugesetzt.

Ligationspuffer:	A	B	C	D	E
GdmHCl	–	6 M	6 M	6 M	–
NaH ₂ PO ₄	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
pH-Wert	7,0	7,5	8,5	7,0	8,0
TCEP	–	50 mM	50 mM	25 mM	–
MES-Na	20 mM	–	–	–	–
Thiophenol	–	5 Vol-%	5 Vol-%	5 Vol-%	5 Vol-%

Reduktionspuffer:	A	B	C	Abspaltpuffer A
GdmHCl	6 M	6 M	6 M	–
Glycin / NaOH	–	–	–	100mM/100mM
NaH ₂ PO ₄	200 mM	200 mM	200 mM	–
pH-Wert	6,5	7,5	8,5	9,0
TCEP	500 mM	500 mM	500 mM	25 mM

6.2.5 Native chemische Verknüpfung

Allgemeine Vorschrift für die Ligation von Penicillaminpeptiden

Die lyophilisierten Peptidfragmente wurden in einem Eppendorfgefäß bei einer Konzentration von 5 mM in entgastem Ligationspuffer B oder C (Abschnitt 6.2.4)

gelöst und in einem Thermoschüttler bei 25 °C oder 37 °C inkubiert. Nach 3, 6 und 9 Stunden wurden der Reduktionspuffer B oder C (8 % des Anfangsvolumens) und 0,8 Vol-% Thiophenol zugesetzt. Nach 12 Stunden erfolgte eine erneute Zugabe des Reduktionspuffers B oder C (16 % des Anfangsvolumens) sowie 1,6 Vol-% Thiophenol. Die Reaktion wurde mittels HPLC überwacht. Dazu wurden den Reaktionsgemischen Aliquote von 5 µl entnommen und diese mit 95 µl einer 1 %igen wässrigen TFA vermischt. Die Berechnung der Ausbeute basierte auf der Integration der HPLC-Spuren unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten. ($\varepsilon_{\text{Peptidthioester}} = \varepsilon_{\text{Penicillaminpeptid}} = 1280 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\varepsilon_{\text{Ligationsprodukt}} = 2560 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Für die Ausbeutebestimmung von Ligationen mit Peptiden ohne Tyrosin wurden relative Extinktionskoeffizienten abgeschätzt. Hierbei wurden alle Amid- und Carbonsäureeinheiten berücksichtigt; nicht identifizierte HPLC-Peaks wurden als Nebenprodukte betrachtet und in die Berechnungen mit einbezogen. Die Fit-Kurven wurden nach dem Weibull 3-Parameter Modell mit Hilfe der Gleichung

$$f(x) = \delta \exp(-\exp(\beta(\log x - \log \alpha)))$$

mit Hilfe des Statistik-Software R unter Verwendung der Pakete “xlsReadWrite” und “drc” (Analysis of dose-response curves) berechnet.[11] (α - Skalierungsparameter, β - Formparameter und δ - Maximalausbeute).

Allgemeine Vorschrift für die Ligation von Peptiden mit sequenz-internem Cystein

Die lyophilisierten Peptidfragmente wurden in einem Eppendorfgefäß bei einer Konzentration von 5 mM in entgastem Ligationspuffer D gelöst und in einem Thermoschüttler bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels HPLC (Gradient 4) und UPLC-MS (Gradient 11) überwacht. Probenentnahmen erfolgten nach 2, 4, 6, 8, 24 und 48 Stunden, wobei jeweils Aliquoten mit einem Volumen von 5 µl in 95 µl 1 %ige wässrige TFA (HPLC) bzw. 1 µl in 4 µl 5 %ige wässrige Ameisensäure (UPLC) gegeben wurden. Die Berechnung der Ausbeute basierte auf der Integration der HPLC-Spuren unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten. ($\varepsilon_{\text{Peptidthioester}} = \varepsilon_{\text{Cysteinpeptid}} = 1280 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\varepsilon_{\text{Ligationsprodukt}} = 2560 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Die Fit-Kurven wie in der Allgemeine Vorschrift für die Ligation von Penicillaminpeptiden (Abschnitt 6.2.5) beschrieben berechnet.

Optimiertes Protokoll für die Kupplung prolin-haltiger Peptide

Die lyophilisierten Peptidfragmente wurden in einem Eppendorfgefäß bei einer Konzentration von 10 mM (prolin-haltiges Peptid) und 5 mM (Peptidthioester) in entgastem Ligationspuffer E gelöst und bei 35 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Nach 72 Stunden Reaktionszeit wurden 10 Vol-% einer TCEP-Lösung (250 mM) zugesetzt, um die Abwesenheit von Disulfiden zu gewährleisten. Nach 30 Minuten wurden 5 µl der Reaktionslösung in 95 µl 1 %ige wässrige TFA (HPLC) bzw. 1 µl in 4 µl 5%ige wässrige Ameisensäure (UPLC) gegeben. Die so vorbereiten

6.2 Allgemeine Arbeits- und Synthesevorschriften

Proben wurden danach mittels HPLC (Gradient 4) bzw. UPLC-MS (Gradient 11) untersucht. Die Berechnung der Ausbeute basierte auf der Integration der HPLC-Spuren unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten. ($\varepsilon_{\text{Peptidthioester}} = \varepsilon_{\text{Cysteinpeptid}} = 1280 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\varepsilon_{\text{Ligationsprodukt}} = 2560 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

6.2.6 Entschwefelung

Metall-basierte Entschwefelung

Raney-Nickel wurde frisch hergestellt. Dazu wurden NaBH_4 (50 mg) langsam portionsweise in eine Lösung von $\text{Ni}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ (300 mg) in deionisiertem Wasser (1,5 ml) eingebracht. Nach 5 Minuten wurde filtriert und der Feststoff nach und nach mit deionisiertem Wasser (80 ml) gewaschen. Das feuchte aktivierte Raney-Nickel (30 mg) wurde in Wasser und Essigsäure (4:1; 30 μl) suspendiert. Zu der Suspension wurde die Lösung des Peptides (4 – 5 mM, 5 μl) pipettiert. Die Mischung wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Katalysator wurde mit Wasser und Essigsäure (4:1; 30 μl , 3x) extrahiert und die vereinten wässrigen Lösungen dann mittels einer SepakTM Säule vorgereinigt. Dazu wurde die Säule zunächst nach Herstellerangaben equilibriert (2x 1 ml CH_3CN , 3x 1 ml H_2O), die Reaktionslösung dann auf die Säule aufgetragen und mit 5 ml eines CH_3CN - H_2O -Gemisches (4:1) eluiert. Danach wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels HPLC-MS untersucht. Die Berechnung der Ausbeute basiert auf quantitativer HPLC. Dazu wurde eine HPLC-Spur des Eduktpeptides in der in der Reaktion verwendete Menge aufgenommen und diese mit der HPLC-Spur der Reaktion in Beziehung gesetzt.

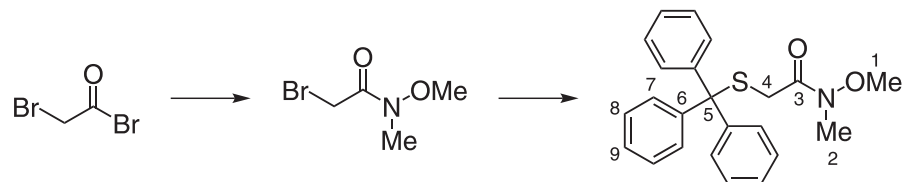
Metall-freie Entschwefelung

Alle Reaktionsschritte wurden unter einer Argongasatmosphäre und in entgasten Lösungsmitteln durchgeführt. Das lyophilisierte Peptid wurde zunächst in Wasser (10 μl) gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Glutathion-Lösung (2,5 μl , 40 mM) und eine Lösung des Radikalstarters VA-044 (2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid) (2 μl , 200 mM) hinzugefügt. Weiterhin erfolgt die Zugabe des Reduktionspuffers A (10 μl). Die Endkonzentration des Peptides betrug 0,5 – 2 mM. Wenn nicht explizit anders angegeben wurde die Reaktionslösung bei 65 °C für 2,5 Stunden inkubiert. Dann wurde die Lösung mit 0,5 %iger wässriger TFA (75 μl) verdünnt und mit Hilfe von HPLC/MS und/oder HPLC/MALDI-TOF-MS untersucht.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1: Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

6.3.1 Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines

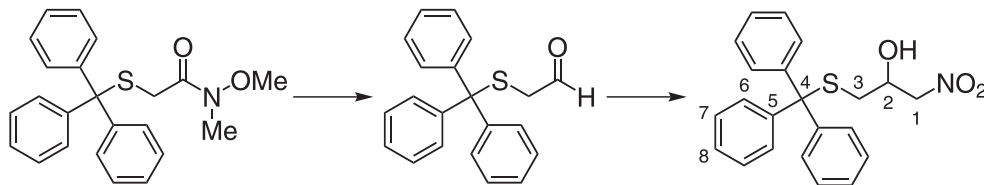
N-Methoxy-*N*-methyl-2-(tritylthio)acetamid (**75**):



N,*O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (6,0 g; 61,5 mmol) und DIPEA (14,1 ml; 19,9 g; 153,8 mmol) wurden bei 0 °C in CH₂Cl₂ (100 ml; wasserfrei) gelöst. Dazu wurde langsam eine Lösung von Bromoacetyl bromid (5,4 ml; 12,4 g; 61,5 mmol) in CH₂Cl₂ (20 ml; wasserfrei) getropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Kühlung entfernt und für 4 Stunden bei RT gerührt. Der Reaktionslösung wurde dann NaHSO₄-Lsg. (100 ml; gesättigt) zugesetzt und die sich dabei bildenden Phasen im Anschluss separiert. Die wäßrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3x 50 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Anschluss zunächst erneut dreimal mit NaHSO₄-Lsg. (gesättigt), dann mit Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 100 ml) gewaschen. Nunmehr wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung und Analytik weiter verwendet (Annahme Ausbeute: 90 %; 10,1 g; 55,5 mmol). Der Rückstand wurde in DMF (125 ml) gelöst und nacheinander zunächst DIPEA (12,7 ml; 17,9 g; 138,8 mmol) und dann Triphenylmethylmercaptan (15,3 g; 55,5 mmol) in 10 Portionen zugegeben. Nach 14 Stunden Rühren bei RT wurde der Hauptteil des Lösungsmittels im Vakuum entfernt. Nach Verteilen des Rückstandes zwischen Diethylether (150 ml) und NaHSO₄-Lsg. (150 ml; gesättigt) wurde eine Phasentrennung vorgenommen und der wäßrige Teil mit Diethylether (3x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden NaHSO₄-Lsg. (3x, gesättigt), Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 100 ml) gewaschen, danach über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt, wobei *N*-Methoxy-*N*-methyl-2-(tritylthio)acetamid nach Evaporation des Lösungsmittels als weißer Feststoff isoliert werden konnte. Ausbeute: 51 mmol; 19,2 g; 82 %. Summenformel: C₂₃H₂₃NO₂S (377,50 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,35 (Cyclohexan:EtOAc = 3:1). Schmelzpunkt: 175 °C. ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 3,05 (s, 2H, H-4); 3,07 (s, 3H, H-2); 3,42 (s, 3H, H-1); 7,15-7,28 (m, 9H, H-7/9); 7,42-7,44 (m, 6H, H-8) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 32,4 (C-2); 33,8 (C-4); 61,4 (C-1); 66,9 (C-5); 126,8 (C-9); 128,0 (C-7); 129,6 (C-8); 144,3 (C-6); 169,9 (C-3) ppm. ESI-HRMS: berechnet: 400,1347 [M+Na]⁺; gefunden: 400,1343.

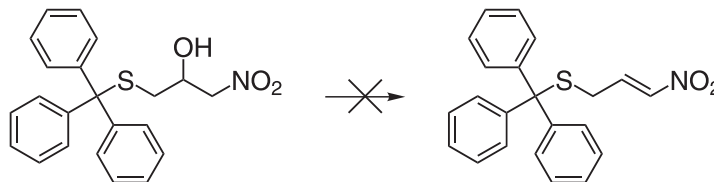
6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

1-Nitro-3-(tritylthio)propan-2-ol (**78**):



N-Methoxy-*N*-methyl-2-(tritylthio)acetamid (**75**) (2,0 g; 5 mmol) wurde in THF (60 ml; wasserfrei) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der Lösung wurde LiAlH₄-Lösung (1 M in THF; 6,4 ml; 6,4 mmol) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 15 Minuten bei 0 °C gerührt und die Reaktion anschließend unter fortwährender Kühlung durch Zugabe von NaHSO₄-Lsg. (500 ml; gesättigt) beendet. Die Phasen wurden getrennt, der wäßrige Teil mit EtOAc (3x 50 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend mit Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 200 ml) gewaschen. Danach wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand (*R_f* = 0,7 (Cyclohexan:EtOAc = 3:1); Annahme Ausbeute: 97 %; 1,64 g; 5,2 mmol) wurde ohne weitere Reinigung und Analytik weiter verwendet und dazu in Nitromethan (2,9 ml; 3,2 g; 52 mmol) gelöst. Zu der Lösung wurde eine methanolische KOH-Lösung (3 M; 3,5 ml; 10,4 mmol) getropft. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde NaHSO₄-Lsg. (50 ml; gesättigt) zugesetzt und mit Diethylether (3x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden mit NaHSO₄-Lsg. (3x; gesättigt), Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 150 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt, wobei 1-Nitro-3-(tritylthio)propan-2-ol nach Evaporation des Lösungsmittels als weißer Feststoff isoliert werden konnte. Ausbeute: 2 mmol; 0,7 g; 35 %. Summenformel: C₂₂H₂₁NO₃S (379,47 g · mol⁻¹). *R_f*-Wert: 0,5 (Cyclohexan:EtOAc = 3:1). Schmelzpunkt: 129 °C. ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 2,38 (dq, *J* = 6,5; 13,4 Hz; 2H, H-3); 2,52 (br s, 1H, OH); 3,65 (m, 1H, H-2); 4,04 (m, 2H, H-1); 7,11-7,23 (m, 9H, H-6/8); 7,32-7,35 (m, 6H, H-7) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 35,5 (C-3); 67,4 (C-4); 67,5 (C-2); 79,1 (C-1); 127,1 (C-8); 128,2 (C-6); 129,5 (C-7); 144,2 (C-5) ppm. ESI-HRMS: berechnet: 402,1139 [M+Na]⁺; gefunden: 402,1134.

Versuch zur Synthese von 3-(Nitroallyl)(trityl)sulfan (**72**)



1-Nitro-3-(tritylthio)propan-2-ol (**78**) (100 mg; 0,3 mmol) und TEA (150 µl; 107 mg; 1,2 mmol) wurden in CH₂Cl₂ (8 ml; wasserfrei) gelöst. Zu dem Gemisch wurde

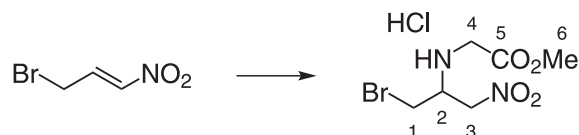
6.3.1 Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines

langsam Mesylchlorid (41 μ l; 61 mg; 0,6 mmol) getropft. Nach 90 Minuten Rühren bei RT wurde die Lösung mit NH_4Cl -Lsg. (8 ml; gesättigt) versetzt. Nach Trennung der Phasen wurden der wäßrige Teil mit CH_2Cl_2 (3x 2 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit NaHCO_3 -Lsg. (gesättigt), Wasser und NaCl -Lsg. (gesättigt) (je 8 ml) gewaschen, dann über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel anschließend evaporiert. Der Rückstand (Masse: 120 mg) wurde an Kieselgel (600 mg) adsorbiert und über Kieselgel (12 g) chromatographiert (mobile Phase: von Cyclohexan; 2 % EtOAc auf Cyclohexan; 12 % EtOAc). Danach wurde die Trennsäule mit Aceton gespült. Die Masse des einzigen einheitlichen Produktpots betrug 22 mg, wohingegen beim Auswiegen der Restsubstanz 87 mg ermittelt wurden. Die Fraktion des Produktpots wurde in CH_2Cl_2 (50 μ l) gelöst. Diese Lösung wurde auf eine präparative DC-Platte aufgetragen und erneut chromatographiert (mobile Phase: Cyclohexan:EtOAc 9:1). Das so isolierte Substanz (Masse: 8 mg) wurde mittels NMR untersucht. Da das ^1H -NMR-Spektrum zur Strukturaufklärung nicht ausreichte, sollte ein ^{13}C -NMR-Spektrum weitere Informationen liefern. Im Anschluss an dessen Anfertigung wurde erneut ein ^1H -NMR-Spektrum gemessen, was sich jedoch stark von dem zuvor angefertigten ^1H -NMR-Spektrum unterschied. Auch bei der daraufhin durchgeführten DC-Kontrolle wurden Anzeichen von Zersetzung deutlich. Die Syntheseroute wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

3-Brom-1-nitroprop-1-en (**71**)[147]:

Die Verbindung wurde weitestgehend entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt. Die vollständige Umsetzung des Allylbromides im ersten Reaktionsschritt wurde folgendermaßen überprüft. Bei Zugabe einer Probe der klaren Reaktionslösung zu einer gesättigten alkoholischen Silbernitrat-Lösung bildete sich nach Erhitzen kein Niederschlag mehr. Ausbeute: 31 mmol; 5,1 g; 87 % (über drei Stufen). Summenformel: $\text{C}_3\text{H}_4\text{BrNO}_2$ (165,97 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,6 (Cyclohexan:EtOAc = 2:1). Die ermittelten analytischen Daten stimmten mit den veröffentlichten Daten überein.

Methyl-2-(1-brom-3-nitro-2-ylamino)acetathydrochlorid (**82**):

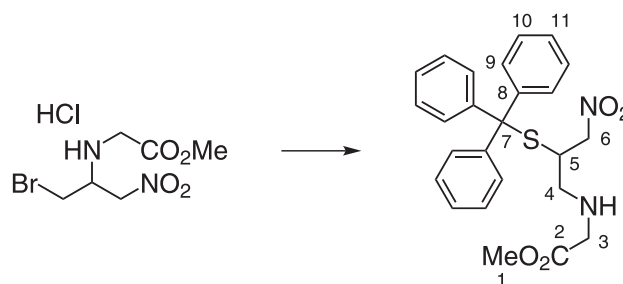


Glycinmethylesterhydrochlorid (4,5 g; 36 mmol) und NaHCO_3 (6,1 g; 72 mmol) wurden in Toluol (360 ml) und Wasser (1 ml) suspendiert. Nach Zugabe von 3-Brom-1-nitroprop-1-en (**71**) (6,0 g; 36 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 40 Stunden bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren des verbliebenen Feststoffes wurde das Filtrat über MgSO_4 getrocknet. Alle Feststoffe wurden zweimal mit Toluol (10 ml) gewaschen und die Waschlösung mit der Reaktionslösung vereinigt. In die Lösung

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

wurde sodann HCl-Gas eingeleitet, dass durch die Einwirkung von H_2SO_4 auf Kochsalz (NaCl) gewonnen wurde. Das als Feststoff angefallene Methyl-2-(1-brom-3-nitro-2-ylamino)acetathydrochlorid wurde abgesaugt. Ausbeute: 36 mmol; 10,4 g; 98 %. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BrClN}_4\text{O}$ ($291,53 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,45 (Cyclohexan:EtOAc = 2:1). Schmelzpunkt: 145°C . $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz, 25°C): $\delta = 1,97$ (br s, 1H, N-H); 3,51 (s, 2H, H-4); 3,58 (m, 3H, H-1, H-2); 3,74 (s, 3H, H-6); 4,55 (m, 2H, H-3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz, 25°C): $\delta = 33,3$ (C-1); 48,5 (C-4); 50,1 (C-2); 56,2 (C-6); 77,6 (C-3); 172,2 (C-5) ppm. ESI-MS: berechnet: 255,0 $[\text{M-Cl}]^+$; gefunden: 255,0.

Methyl-2-(3-nitro-2-(tritylthio)propylamino)acetat (**84**):



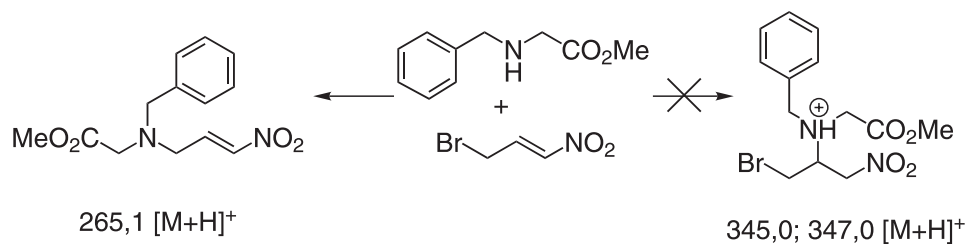
Zu einer Lösung von Tritylmercaptan (1,4 g; 5 mmol) in DMF (38 ml; wasserfrei) wurde DIPEA (1,7 ml; 1,3 g, 10 mmol) gegeben. Nach 15 min wurde der Lösung eine Suspension von Methyl-2-(1-brom-3-nitro-2-ylamino)acetathydrochlorid (**83**) (1,3 g; 5 mmol) in DMF (25 ml; wasserfrei) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde nach 1,5 Stunden mit Wasser (100 ml) und EtOAc (80 ml) verdünnt und anschließend mit EtOAc (3x 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit NH_4Cl -Lsg. (gesättigt), Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 100 ml) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 und Entfernung des Lösungsmittels konnte Methyl-2-(3-nitro-2-(tritylthio)propylamino)acetat durch Flash-Säulenchromatographie nach Evaporation des Laufmittels als weißer Feststoff isoliert werden. Ausbeute: 2 mmol; 1,1 g; 47 %. Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($450,55 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,5 (Cyclohexan:EtOAc = 2:1). Schmelzpunkt: 183°C . $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz, 25°C): $\delta = 1,86$ (br s, 1H, NH); 2,75 (dd, $J = 4,7; 13,1 \text{ Hz}$; 1H, H-4); 2,89 (dd, $J = 6,4; 13,1 \text{ Hz}$; 1H, H-4'); 3,12 (m, 1H, H-5); 3,32 (dd, $J = 17,4; 23,1 \text{ Hz}$; 2H, H-3, H-3'); 3,59 (dd, $J = 3,5; 13,6$; 1H, H-6); 3,72 (s, 3H, H-1); 4,31 (dd, $J = 9,4; 13,6$; 1H, H-6'); 7,29 (m, 9H, H-9, H-11); 7,59 (m, 6H, arom./H-10) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz, 25°C): $\delta = 41,9$ (C-5); 50,4 (C-3); 50,7 (C-4); 51,5 (C-1); 67,9 (C-7); 75,6 (C-6); 126,8 (C-11); 128,0 (C-9); 129,1 (C-10); 143,9 (C-8); 172,3 (C-2) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 451,1686 $[\text{M+H}]^+$; gefunden: 451,1687.

6.3.1 Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines

N-Benzylglycinmethylester (**88**)[125]:

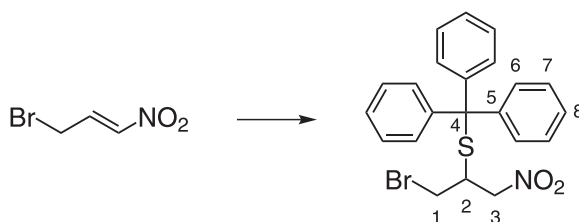
Die Verbindung wurde entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt. Ausbeute: 4 mmol; 0,7 g; 60 %. Summenformel: C₁₀H₁₃NO₂ (179,22 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,3 (Cyclohexan:EtOAc = 2:1). Die ermittelten analytischen Daten stimmten mit den veröffentlichten Daten überein.

Reaktion von 3-Brom-1-nitroprop-1-en (**71**) und *N*-Benzylglycinmethylester (**88**)



3-Brom-1-nitroprop-1-en (**71**) (15 mg; 0,1 mmol) und *N*-Benzylglycinmethylester (**88**) (16 mg; 0,1 mmol) wurden in Toluol (1 ml) gelöst. Das Gemisch wurde für 20 Stunden bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle konnte kein Umsatz verzeichnet werden und der Reaktionsansatz wurde über 2 Stunden refluxiert. Danach war der *N*-Benzylglycinmethylester verbraucht und ein neues Produkt war entstanden. Das Lösemittel wurde evaporiert und der Rückstand (26 mg) mit Hilfe von HPLC-MS analysiert (Gradient 9; Detektionswellenlänge $\lambda = 254$). Im Chromatogramm erschien lediglich ein Peak bei R_t = 18,6 min. Im korrespondierenden Massenspektrum wurde ausschließlich die Masse [M+H]⁺ = 265,2 angezeigt. Dieser Wert konnte dem tertiären Amin **87** (berechnet: [M+H]⁺ = 265,1) zugeordnet werden, das selektiv als Produkt einer nucleophilen Substitution des Bromatoms in **71** durch **88** entstanden war. Die Addition an das elektronenarme Olefin in **71** war nicht erfolgt.

(1-Brom-3-nitropropan-2-yl)(trityl)sulfan (**90**):

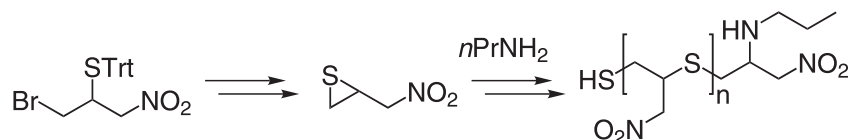


Tritylmercaptan (1,0 g; 3,6 mmol) und Natriumhydrogencarbonat (0,3 g; 3,6 mmol) wurden in THF (36 ml) gelöst bzw. suspendiert. Nach der Zugabe von 3-Brom-1-nitroprop-1-en (**71**) wurde das Reaktionsgemisch für die Dauer von 3 Stunden refluxiert und anschließend 15 Stunden bei RT gerührt. Nach Verteilen der Suspension zwischen Wasser und EtOAc (je 40 ml) wurden die sich bildenden

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

Phasen getrennt und der wäßrige Teil mit EtOAc (2x 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NH_4Cl -Lsg. (gesättigt), Wasser und NaCl -Lsg. (gesättigt) (je 100 ml) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 und Entfernung des Lösungsmittels konnten 1-Brom-3-nitropropan-2-yl(trityl)sulfan Flash-Säulenchromatographie nach Evaporation des Lösungsmittels als weißer Feststoff isoliert werden. Ausbeute: 3 mmol; 1,2 g; 75 %. Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BrNO}_2\text{S}$ (442,37 g · mol⁻¹). R_f -Wert: 0,65 (Cyclohexan:EtOAc = 2:1). Schmelzpunkt: 167 °C. ¹H-NMR: (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): δ = 3,13 (td, J = 3,8; 11,3 Hz; 1H, H-2); 3,22 (dd, J = 3,8; 10,7 Hz; 1H, H-1); 3,59 (dd, J = 10,7; 7,6 Hz; 1H, H-1'); 3,92 (dd, J = 2,0; 7,2 Hz; 1H, H-3); 4,34 (dd, J = 7,6; 14,3 Hz; 1H, H-3'); 7,29 (m, 9H, H-6/8); 7,52 (m, 6H, H-7) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl_3 , 75 MHz, 25 °C): δ = 34,3 (C-1); 42,3 (C-2); 68,2 (C-4); 75,5 (C-3); 127,3 (C-8); 128,4 (C-6); 129,1 (C-7); 143,7 (C-5) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-MS: berechnet: 442,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 442,1.

Experimente zur Thiirancyclisierung und Ringöffnung:

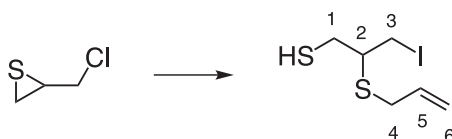


1. (1-Brom-3-nitropropan-2-yl)(trityl)sulfan (**90**) (50 mg; 0,1 mmol) und TIS (25 μl , 0,1 mmol) wurden in CH_2Cl_2 (2,5 ml; wasserfrei) gelöst. Die Lösung wurde mit TFA (2,5 ml) vermischt und dann 30 min bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand erneut in CH_2Cl_2 (0,5 ml) gelöst und dann *n*-Propylamin (11 μl ; 0,12 mmol) zugegeben. Der ausgefallene Feststoff (8 mg) wurde durch Zentrifugation abgetrennt und das Lösemittel dann evaporiert. Der Rückstand (63 mg) wurde mittels Säulenchromatographie (mobile Phase: von CH_2Cl_2 bis CH_2Cl_2 :MeOH 10:1) aufgereinigt. Die so isolierten Substanzen konnten als Triphenylmethan (26 mg) und *n*-Propylamintrifluoressigsäuresalz (24 mg) identifiziert werden. Das ¹H-NMR-Spektrum des ausgefallenen Feststoffes wurden dahingehend interpretiert, dass ein Gemisch verschiedener oligomerer Nitromethylthioether vorlag.
2. (1-Brom-3-nitropropan-2-yl)(trityl)sulfan (**90**) (100 mg; 0,2 mmol) und TIS (50 μl , 0,2 mmol) wurden in CH_2Cl_2 (5 ml; wasserfrei) gelöst. Die Lösung wurde mit TFA (5 ml) vermischt und dann 30 min bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit TFA (0,4 ml) und das Gemisch in CH_2Cl_2 (200 ml) gelöst. Diese Lösung wurde bei 0 °C langsam (50 ml/h) zu einer Lösung von TEA (1,2 ml; 9 mmol) und *n*-Propylamin (0,2 ml; 2,5 mmol) in CH_2Cl_2 (100 ml) getropft. Anschließend wurde 24 Stunden bei RT gerührt und die Lösung dann mittels DC untersucht. Die Lösung

6.3.1 Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines

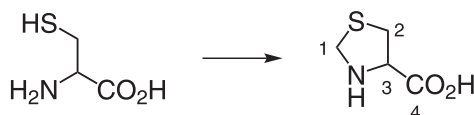
wurde dann über Kieselgel (15 g; Ø 3,5 cm) filtriert und das Kieselgel im Anschluss mit weiterem CH₂Cl₂ (100 ml) nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand aufgrund einer auftretenden Verfärbung erneut mittels DC untersucht, wobei im Vgl. zur zuvor ausgeführten DC die Bildung zahlreicher neuer Spot beobachtet werden konnte. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie gereinigt, wobei nur die Spots isoliert wurden, die auf dem ersten DC sichtbar waren. Außer TEA konnte jedoch mittels NMR keine Verbindung identifiziert werden.

2-(Allylthio)-3-iodopropan-1-thiol (**99**):



Einer Lösung von Natriumiodid (135 mg, 0,92 mmol) in Aceton (0,9 ml) wurde Epithiochlorhydrin (82 µl; 100 mg; 0,92 mmol) zugesetzt und das Gemisch anschließend für 2 Stunden refluxiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der ölige Teil des Rückstandes in Diethylether (5 ml) gelöst. Die Lösung wurde mit Na₂S₂O₃-Lsg. (5 %ig), NH₄Cl-Lsg. (gesättigt), NaHCO₃-Lsg. (gesättigt), Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 10 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels konnte 2-(Allylthio)-3-iodopropan-1-thiol durch Destillation (100 °C, 2,0 mbar) als farbloses Öl isoliert werden. Ausbeute: 0,3 mmol; 90 mg; 96 %. Summenformel: C₆H₁₁IS₂ (274,94 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,7 (Cyclohexan:EtOAc = 10:1). ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 3,09 (tdd, J = 4,8; 6,5; 7,6 Hz; 1H; H-2); 3,38 (dt, J = 0,9; 7,3 Hz; 2H; H-4); 3,54 (dd, J = 10,3; 7,6 Hz; 1H; H-3); 3,64 (dd, J = 10,3; 4,8 Hz; 1H; H-3'); 3,82 (dd, J = 11,6; 6,5 Hz; 1H; H-1); 3,95 (dd, J = 11,6; 4,8 Hz; 1H; H-1'); 5,24 (m, 2H; H-6); 5,85 (tdd, J = 17,2; 9,8; 7,4 Hz; 1H; H-5) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 6,5 (C-3); 42,8 (C-4), 46,48 (C-1), 53,78 (C-2), 119,38 (C-6), 132,78 (C-5) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 274,9419 [M+H]⁺; gefunden: 274,9421.

Thiazolidin-4-carbonsäure (**100**)[20]:

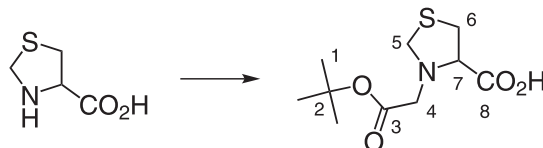


Die Verbindung wurde entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt. Ausbeute: 0,3 mol; 40,1 g; 57 %. Summenformel: C₄H₇NO₂S (133,17 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,9 (MeOH, 2 % Ameisensäure). Schmelzpunkt: 197 °C. ¹H-NMR: (DMSO-d₆, 300

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

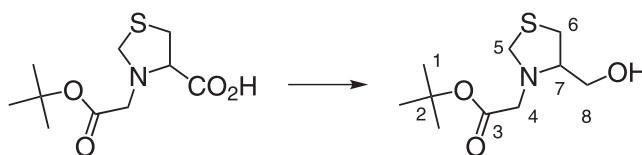
MHz, 25 °C): δ = 2,81 (dd, J = 6,8; 10,1 Hz; 1H; H-2); 3,07 (dd, J = 7,1; 10,1 Hz; 1H; H-2'); 3,83 (t, J = 6,8 Hz; 1H; H-3); 4,02 (d, J = 9,0 Hz; 1H; H-1); 4,21 (d, J = 9,0 Hz; 1H; H-1') ppm. ^{13}C -NMR: (DMSO- d_6 , 75 MHz, 25 °C): δ = 41,3(C-2); 59,1 (C-1), 70,3 (C-3); 177,7 (C-4) ppm.

N-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)thiazolidin-4-carbonsäure (**101**):



Thiazolidin-4-carbonsäure (**100**) (11,2 g; 84 mmol) und K_2CO_3 (11,7 g; 84 mmol) wurden in Wasser und EtOH (1:1, 44 ml) unter Erwärmen gelöst. Dann wurde Bromessigsäure-*tert*-butylester (7,4 ml; 9,9 g; 51 mmol) hinzu gegeben und das Reaktionsgemisch anschließend für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde die Mischung unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen und durch Zugabe einer Zitronensäurelösung (0,5 M, 55 ml) auf den pH-Wert pH = 5,0 gebracht. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde der wäßrige Teil mit CH_2Cl_2 (3x 20 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte anschließend mit Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 15 ml) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Durch Umkristallisation des Rückstandes aus Cyclohexan und EtOAc (2,5:1) konnten das Produktes als weißer Feststoff isoliert werden. Ausbeute: 24 mmol; 6,0 g; 48 %. Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$ (247,09 g · mol $^{-1}$). R_f -Wert: 0,6 (EtOAc). Schmelzpunkt: 163 °C. ^1H -NMR: (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): δ = 1,48 (s; 9H; H-1); 3,22 (dd, J = 8,3; 11,6 Hz; 1H; H-6); 3,45 (d; J = 17,5 Hz; 1H; H-4); 3,49 (dd; J = 3,4; 11,6 Hz; 1H; H-6'); 3,52 (d; J = 17,5 Hz; 1H; H-4'); 3,98 (m; 2H; H-7, H-5); 4,15 (d; J = 10,4 Hz; 1H; H-5'); 10,01 (br s; 1H; H-8) ppm. ^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 75 MHz, 25 °C): δ = 28,05 (C-1); 32,46 (C-6); 57,27 (C-4); 59,55 (C-5); 70,38 (C-7); 83,13 (C-2); 170,48 (C-8); 172,09 (C-3) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). Elementaranalyse: berechnet: C = 48,57; H = 6,93; N = 5,66; S = 12,97; gefunden: C = 48,38; H = 6,88; N = 5,49; S = 12,88.

tert-Butyl-2-(4-(hydroxymethyl)thiazolidin-3-yl)-acetat (**102**):

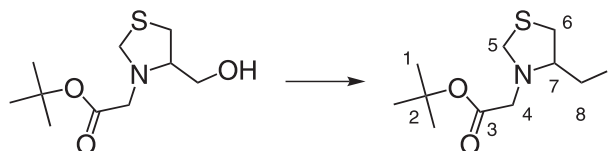


Zu der Lösung von *N*-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)thiazolidin-4-carbonsäure (**101**) (3,5 g; 14 mmol) in THF (30 ml; wasserfrei) wurde bei 0 °C zunächst TEA (2,2 ml;

6.3.1 Versuche zur Synthese eines Nitroauxiliarbausteines

1,6 g; 16 mmol) und danach vorsichtig Chlorkohlensäuremethylester (1,2 ml; 1,5 g; 16 mmol) getropft. Nach 2,5 Stunden Rühren bei 0 °C wurde die Mischung filtriert und das Filtrat dann langsam bei 0 °C zu einer Suspension von Natriumborhydrid (2,6 g; 69 mmol) in Wasser (15 ml) getropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Kühlung entfernt und weitere 3 Stunden bei RT gerührt. Dann wurde die Mischung unter Eiskühlung durch Zugabe einer Zitronensäurelösung (0,5 M; 50 ml) auf pH = 5,0 gebracht. Danach wurde die Lösung mit EtOAc (3x, 20 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend mit NaHCO₃-Lsg. (gesättigt), Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 15 ml) gewaschen, dann über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus Cyclohexan umkristallisiert. Ausbeute: 6 mmol; 1,5 g; 44 %. Summenformel: C₁₀H₁₉NO₃S (233,11 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,2 (Cyclohexan:EtOAc = 5:1). Schmelzpunkt: 127 °C. ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 1,45 (s, 9H, H-1); 2,55 (dd, J = 3,1; 11,0 Hz; 1H; H-6); 3,00 (dd, J = 3,9; 11,1 Hz; 1H, H-6'); 3,18 (d, J = 17,1 Hz; 1H; H-4); 3,30 (d, J = 17,1 Hz; 1H; H-4'); 3,32 (d, J = 11,0 Hz; 1H; H-8); 3,40 (dd, J = 4,9; 11,0 Hz; 1H; H-8'); 3,54 (m; 1H; H-7); 4,00 (dd, J = 0,7; 10,6 Hz; 1H; H-5); 4,19 (d, J = 10,6 Hz; 1H; H-5') ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 28,01 (C-1); 31,61 (C-6); 56,96 (C-4); 58,68 (C-5); 62,02 (C-8); 70,99 (C-7); 81,88 (C-2); 170,30 (C-3) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 256,0983 [M+Na]⁺; gefunden: 256,0980.

tert-Butyl-2-(4-(iodmethyl)thiazolidin-3-yl)-acetat (**103**):



tert-Butyl-2-(4-(hydroxymethyl)thiazolidin-3-yl)-acetat (**102**) (2,2 mmol, 0,5 g) und Triphenylphosphan (0,8 g, 3 mmol) wurden in Toluol (8,5 ml; wasserfrei) gelöst. Danach wurde DIAD (0,5 ml, 2,6 mmol) und anschließend eine Lösung von Methyljodid (0,2 ml, 2,6 mmol) in Toluol (1 ml; wasserfrei) zugetropft. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt, dann filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Flash-Säulenchromatographie konnte das Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels als farbloses Öl erhalten werden. Ausbeute: 0,7 mmol; 0,23 g; 31 %. Summenf.: C₁₀H₁₈INO₂S (343,22 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,4 (Cyclohexan:EtOAc = 5:1). ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 1,47 (s; 9H; H-1); 2,97 (dd, J = 3,2; 11,2 Hz; 1H; H-6); 3,05 (dd, J = 6,3; 11,2 Hz; 1H; H-6'); 3,10 (t, J = 9,2 Hz; 1H; H-8); 3,16 (d, J = 15,8 Hz; 1H; H-4); 3,24 (dd, J = 5,1; 9,2 Hz; 1H; H-8'); 3,27 (d, J = 15,8 Hz; 1H; H-4'); 3,65 (m; 1H; H-7); 4,03 (d, J = 10 Hz; 1H; H-5); 4,18 (d, J = 10,0 Hz; 1H; H-5') ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 7,45 (C-8); 28,13 (C-1); 34,35 (C-6); 56,09 (C-4); 58,48 (C-5); 70,39 (C-7); 81,74 (C-2); 169,34 (C-3) ppm (Die Signalzuordnung ba-

siert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 343,01; gefunden: 343,01.

6.3.2 Versuche und Vorschriften zur Synthese eines Nitrilauxiliarglycinbausteines

Thiobenzoessäurephenylselenid (**106**)[134]:

Die Verbindung wurde entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt. Ausbeute: 13 mmol; 3,9 g; 83 %. Summenformel: $C_{13}H_{10}NOSSe$ ($293,96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,7 (Cyclohexan:EtOAc = 10:1). Die ermittelten analytischen Daten stimmen mit den veröffentlichten Daten überein.

S-3-Cyano-2-(phenylselanyl)propyl-benzothioat (**107**) [135]:

Die Verbindung wurde entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt. Ausbeute: 2,3 mmol; 0,84 g; 68 %. Summenformel: $C_{17}H_{15}NOSSe$ ($360,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,2 (Cyclohexan:EtOAc = 10:1). Die ermittelten analytischen Daten stimmen mit den veröffentlichten Daten überein.

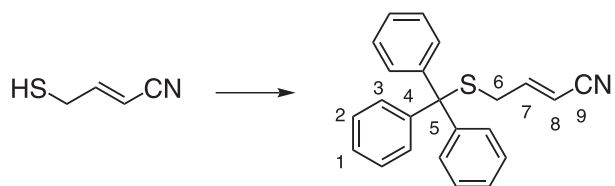
Cyanoallylbenzothioat (**108**)[135]:

Der auf -78°C gekühlten Lösung von *S*-3-Cyano-2-(phenylselanyl)propyl-benzothioat (**107**) (0,77 g; 2,1 mmol) in CH_2Cl_2 (25 ml; wasserfrei) wurde eine Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton (70 mM; 30,5 ml; 2,1 mmol) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde sofort aufgetaut und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie konnte das Produkt als farbloses Öl isoliert werden. (E/Z-Isomerengemisch 52:48; (^1H -NMR)). Ausbeute: 2 mmol; 0,4 g; 94 %. Summenformel: $C_{11}H_9NOS$ ($203,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,2 (Cyclohexan:EtOAc = 10:1). Die ermittelten analytischen Daten stimmen mit den veröffentlichten Daten überein.

4-Mercaptobut-2-en-nitril (**110**)[26]:

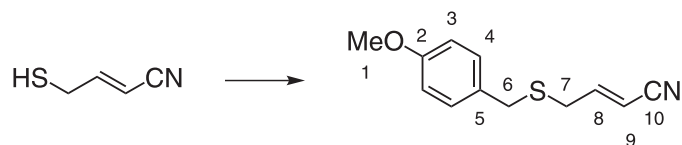
Die Verbindung wurde entsprechend der Literaturvorschrift hergestellt. Ausbeute: 42 mmol; 4,2 g; 62 %. Summenformel: C_4H_5NS ($99,15 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,5 (Cyclohexan:EtOAc = 3:1). Die ermittelten analytischen Daten stimmen mit den veröffentlichten Daten überein.

4-(Tritylthio)but-2-enitril (**113**):



4-Mercaptobut-2-enitril (**110**) (350 mg; 3,5 mmol) und Triphenylmethanol (767 mg; 3,0 mmol) wurden in CH_2Cl_2 (50 ml; wasserfrei) gelöst und anschließend TFA (0,14 ml; 200 mg; 1,8 mmol) zugegeben. Die gelb gefärbte Lösung wurde über 16 Stunden bei RT gerührt, dann durch dreimalige Behandlung mit NaHCO_3 -Lsg. (50 ml; gesättigt) neutralisiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und NaCl -Lsg. (50 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel danach evaporiert. Bei der Reinigung des Rückstand mit Hilfe von Flash-Säulenchromatographie (mobile Phase: Toluol/Cyclohexan) konnte das Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels als weißer Feststoff isoliert werden. Ausbeute: 1,5 mmol; 520 mg; 52 %. Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NS}$ (341,49 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,7 (Cyclohexan:EtOAc = 3:1). Schmelzpunkt: 149 °C. ^1H -NMR: (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): δ = 4,13 (dd, J = 1,5; 7,2 Hz; 2H, H-6); 5,71 (td, J = 1,5; 16,1 Hz; 1H; H-8); 6,57 (td, J = 7,2; 16,1 Hz; 1H; H-7); 7,28 - 7,45 (m, 15H) ppm. ^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 75 MHz, 25 °C): δ = 34,05 (C-6); 67,83 (C-5); 100,95 (C-8); 116,86 (C-9); 127,15 (C-1); 128,17 (C-3); 144,11 (C-4); 149,92 (C-7) ppm. ESI-HRMS: berechnet: 364,1130 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gefunden: 364,1126.

4-(Methoxybenzylthio)but-2-enitril (**114**):

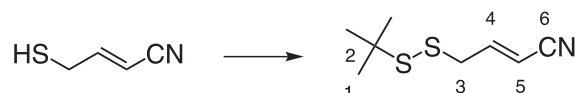


Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 4-Mercaptobut-2-enitril (**110**) (5,7 g; 58 mmol) in CH_2Cl_2 (45 ml; wasserfrei) und TFA (6 ml; 8,6 g; 73,7 mmol) wurde langsam eine Lösung von *p*-Methoxybenzylchlorid (7,8 ml; 9,0 g, 14 mmol) in CH_2Cl_2 (35 ml; wasserfrei) zugetropft und anschließend für eine Dauer von 16 Stunden bei RT gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung durch Zugabe von NaHCO_3 -Lsg. (200 ml; gesättigt) neutralisiert. Nach Trennung der Phasen wurde mit CH_2Cl_2 (3x 50ml) extrahiert und die organische Phase dann mit Wasser und NaCl -Lsg. (gesättigt) (je 100ml) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt, wobei das Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels als farbloses Öl isoliert werden konnte. Diese Vorschrift orientiert sich an [118]. Ausbeute: 25 mmol; 5,5 g; 44 %. Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NOS}$ (219,30

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

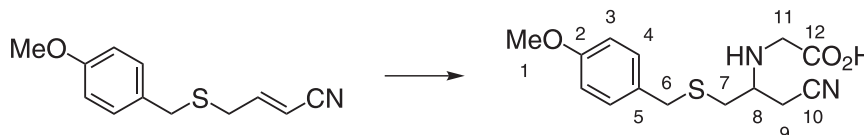
$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,5 (Cyclohexan:EtOAc = 3:1). $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): 4,13 (dd, $J = 1,5$; 7,1 Hz; 2H, H-7); 4,54 (s, 2H; H-6); 4,67 (s, 3H; H-1); 5,83 (td, $J = 1,5$; 16,1 Hz; 1H, H-9); 6,78 (dt, $J = 7,1$; 16,1 Hz; 1H, H-8); 6,96 (d, $J = 8,7$ Hz; 2H, H-3); 7,22 (d, $J = 8,7$ Hz; 2H, H-2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz, 25 °C): $\delta = 32,49$ (C-7); 34,93 (C-6); 55,32 (C-1); 101,20 (C-9); 114,14 (C-3); 116,86 (C-10); 128,79 (C4); 130,06 (C-5); 150,38 (C-8); 158,97 (C-2) ppm. EI-HRMS: berechnet: 219,0718; gefunden: 219,0718.

4-(tert-Butyldisulfanyl)but-2-enitril (**115**):



4-Mercaptobut-2-enitril (**110**) (0,95 g; 9,6 mmol) und Methoxycarbonylsulfonylchlorid (0,87 ml; 1,2 g; 9,6 mmol) wurden in MeOH (20 ml) gelöst und über 48 Stunden bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie (mobile Phase: Cyclohexan/EtOAc) gereinigt. Das dabei gewonnene Öl wurde direkt weiter umgesetzt, indem es mit 2-Methyl-2-propanthiol (5,9 ml; 4,7 g; 52 mmol) in MeOH (10 ml) für 48 Stunden bei RT gerührt wurde. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt. Das Produkt konnte dadurch nach Evaporation des Lösungsmittels als farbloses Öl isoliert werden. Ausbeute: 4,8 mmol; 0,9 g; 50 % (über zwei Stufen). Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NS}_2$ ($187,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,5 (Cyclohexan:EtOAc = 10:1). $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): 1,31 (s, 9H; H-1); 3,36 (dd, $J = 1,3$; 7,6 Hz; 2H; H-3); 5,38 (td, $J = 1,3$; 16,1 Hz; 1H; H-5); 6,63 (td, $J = 7,6$; 16,1 Hz; 1H; H-4) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz, 25 °C): $\delta = 30,00$ (C-1); 41,63 (C-3); 48,39 (C-2); 101,98 (C-5); 116,98 (C-6); 149,05 (C4) ppm. EI-HRMS: berechnet: 187,0489; gefunden: 187,0489.

2-(3-(4-Methoxybenzylthio)-1-cyanopropan-2-ylamino)essigsäure (H-Nag(PMB)-OH) (**117**):

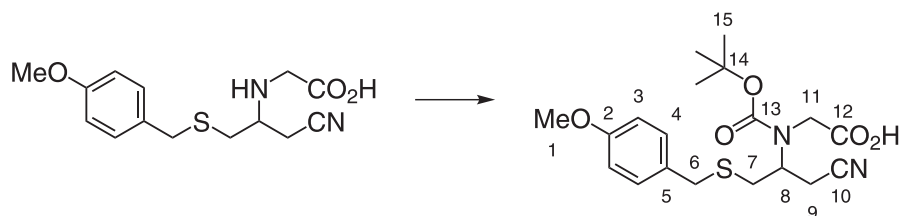


NaOH (1,7 g; 42 mmol) wurde in Wasser (2,5 ml) und EtOH (6 ml) gelöst. In dieser Lösung wurden 4-(Methoxybenzylthio)but-2-enitril (**114**) (4,56 g; 21 mmol) und Glycin (3,12 g; 42 mmol) gelöst bzw. suspendiert und danach 24 Stunden auf 80 °C erhitzt. Danach wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in MeOH (10 ml), Acetonitril (10 ml), Wasser (5 ml) und Ameisensäure (0,5 ml) wieder vollständig gelöst und dann auf Kieselgel (10 g) adsorbiert.

6.3.2 Vorschriften zur Synthese von Nitrilauxiliarglycin

Mit Hilfe von Säulenchromatographie (mobile Phase: CH₂Cl₂/MeOH 10:1 + 0,1 % Ameisensäure) konnte das Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels als weißer Feststoff isoliert werden. gereinigt, wobei 5,6 g (91 %) eines weißen Feststoffes isoliert werden konnten. Ausbeute: 19 mmol; 5,6 g; 91 %. Summenformel: C₁₄H₁₈N₂O₃S (294,37 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,55 (CH₂Cl₂:MeOH = 5:1). Schmelzpunkt: 128 °C. ¹H-NMR: (DMSO-d₆, 300 MHz, 25 °C): δ = 2,52 (dq, J = 6,5; 13,7 Hz; 2H; H-7); 2,7 (dq, J = 5,2; 17,0; 2H, H-9); 2,96 (m, 1H, H-8); 3,31 (dd, J = 17,5; 24,1 Hz; 2H; H-11); 3,72 (s, 2H, H-6); 3,73 (s, 3H; H-1); 6,87 (d, J = 8,7 Hz; 2H, H-3); 7,25 (d, J = 8,7 Hz; 2H, H-4) ppm. ¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 75 MHz, 25 °C): δ = 22,13 (C-9); 34,97 (C-6/7); 35,04 (C-6/7); 48,00 (C-11); 52,90 (C-8); 55,50 (C-1); 114,23 (C-3); 119,22 (C-10); 130,48 (C-4); 130,52 (C-5); 158,66 (C-2); 173,67 (C-12) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 293,0954 [M-H]⁻; gefunden: 293,0955.

2-(*Tert*-butoxycarbonyl(1-cyano-3-(4-methoxybenzylthio)propan-2-yl)amino)essigsäure (Boc-Nag(PMB)-OH) (**118**):

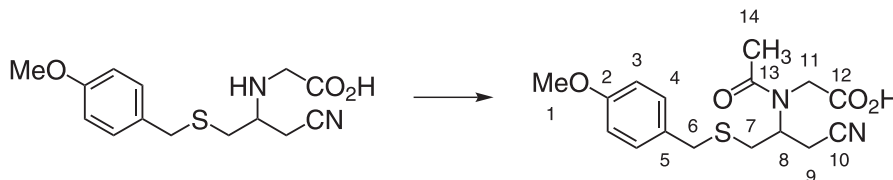


2-(3-(4-Methoxybenzylthio)-1-cyanoprop.-2-ylamino)essigsr. (**117**) (660 mg, 2,24 mmol) wurde in einem Gemisch aus Dioxan (7 ml) NaHCO₃-Lsg. (7 ml; gesättigt) und Wasser (4 ml) verrührt. Dazu wurde Pyrokohlensäure-di-*tert*-butylester (566 µl, 540 mg; 2,47 mmol) gegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch zwischen CH₂Cl₂ (10 ml) und NH₄Cl-Lsg. (10 ml; gesättigt) verteilt. Nach Trennung der Phasen wurde der wässrige Teil mit CH₂Cl₂ (3x 10 ml) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Extrakte mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt, wobei eine amorph erstarrendes Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels isoliert werden konnte. cis-trans-Isomerengemisch (1 : 2 auf Basis von ¹H-NMR). Ausbeute: 0,8 mmol; 300 mg; 34 %. Summenformel: C₁₉H₂₆N₂O₅S (394,49 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,5 (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1). Schmelzpunkt: 159 °C. ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 1,43 (s; 6H; H-15); 1,47 (s; 3H; H-15); 2,76 (m, 4H; H-7; H-9); 3,69 (m, 2H, H-6); 3,79 (s, 3H, H-1); 3,88 (m, 2H, H-11); 4,02 (m, 1H, H-8); 6,85 (m, 2H, H-3); 7,22 (m; 2H, H-4); 8,96 (br s, 1H, H-12) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 20,65; 21,38 (C-9); 28,03; 28,25 (C-15); 32,57; 33,58 (C-7); 35,72; 36,05 (C-6); 47,70; 47,82 (C-11); 53,77; 54,50 (C-8); 55,24 (C-1); 81,85; 82,46 (C-14); 114,05; 114,13 (C-3); 117,39; 117,65 (C-10); 129,33; 129,39 (C-5); 129,88; 130,01 (C-4); 154,10; 154,44 (C-13); 158,80;

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

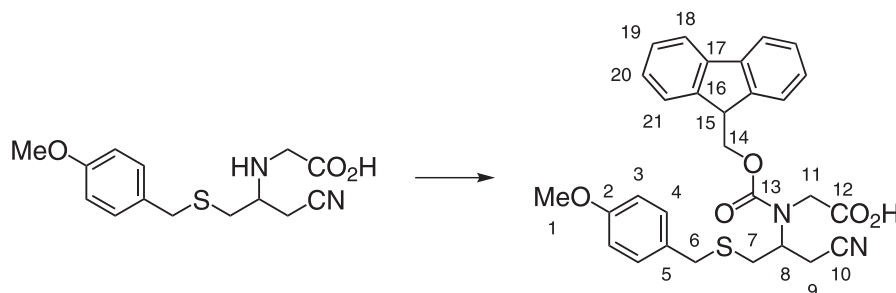
158,89 (C-2); 174,91; 175,39 (C-12) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 394,1562; gefunden: 394,1563.

2-(*N*-(1-cyano-3-(4-methoxybenzylthio)propan-2-yl)acetamido)essigsäure (Ac-Nag(PMB)-OH) (**119**):



2-(3-(4-Methoxybenzylthio)-1-cyanopropan-2-ylamino)essigsr. (**117**) (60 mg; 0,2 mmol) wurde in Pyridin (0,7 ml) und Acetanhydrid (0,5 ml) drei Stunden gerührt. Die Lösung wurde dann zwischen EtOAc (5 ml) und HCl (1 M; 5 ml) verteilt, die wässrige Phase mit EtOAc (5 ml) extrahiert und die vereinigten organische Phasen anschließend über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lag das Produkt als farbloses Öl vor. cis-trans-Isomerengemisch (1 : 1,2 auf Basis von ^1H -NMR). Ausbeute: 0,2 mmol; 66 mg; 92 %. Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (336,41 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). R_f -Wert: 0,25 (CH_2Cl_2 :MeOH:Ameisensäure = 10:1:0,02). Smp.: 136 °C. ^1H -NMR: (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): δ = 2,06 (s, 1,7H, H-14); 2,09 (s, 1,3H, H-14'); 2,57-2,98 (m, 4H; H-7; H-9); 3,67-3,74 (m, 2H, H-6); 3,78 (s, 2H, H-1); 3,79 (s, 1H, H-1'); 3,94-4,09 (m, 2H, H-11); 4,10-4,25 (m, 1H, H-8); 6,86 (m, 2H, H-3); 7,22 (m, 2H, H-4); 9,44 (br s; 1H, H-12) ppm. ^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 75 MHz, 25 °C): δ = 20,21 (C-9); 21,21 (C-14); 21,48 (C-9'); 22,16 (C-14'); 32,18; 33,51 (C-7); 35,82; 36,61 (C-6); 42,92; 49,38 (C-11); 47,70; 47,82 (C-11); 53,41; 54,64 (C-8); 55,25; 55,29 (C-1); 114,09; 114,26 (C-3); 116,70; 117,72 (C-10); 129,13; 129,48 (C-5); 129,84; 129,97 (C-4); 158,76; 159,02 (C-2); 172,05; 172,15 (C-13) 172,44; 172,82 (C-12) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-MS: berechnet: 337,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 337,1.

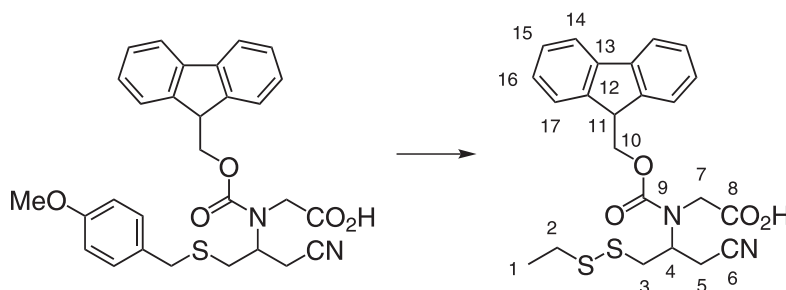
2-((((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(1-cyano-3-(4-methoxybenzylthio)propan-2-yl)amino)essigsäure (Fmoc-Nag(PMB)-OH) (**120**):



2-(3-(4-Methoxybenzylthio)-1-cyanopropan-2-ylamino)essigsäure (**119**) (1,7 g; 5,8 mmol) wurde in Dioxan (20 ml) und NaHCO₃-Lsg. (20 ml; gesättigt) verrührt. Diese Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 9-Fluorenylmethyl-chloroformiat (1,5 g; 5,8 mmol) versetzt und für drei Stunden unter Eiskühlung gerührt. Dann wurde nach Zugabe von EtOAc (30 ml) und mit Salzsäure (1 M; 30 ml) angesäuert. Die Phasen wurden getrennt und die wäßrige Phase mit EtOAc (3x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch die Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie konnte das Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels als weißer Feststoff isoliert werden. cis-trans-Isomerengemisch (1 : 1 auf Basis von ¹H-NMR). Ausbeute: 4,4 mmol; 2,25 g; 75 %. Summenformel: C₂₉H₂₈N₂O₅S (516,61 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,45 (CH₂Cl₂:MeOH:Ameisensäure = 10:1:0,02). Smp.: 136 °C. ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 1,89 (dd, J = 1,6; 6,8 Hz; 1H, H-9); 2,00 (dd, J = 7,5; 14,1; 0,5H, H-7); 2,16 (dd, J = 7,5; 14,1; 0,5H, H-7'); 2,78 (dd, J = 7,5; 14,1 Hz; 0,5H; H-7''); 2,86 (d, J = 6,3; 1H, H-9'); 2,90 (dd, J = 7,5; 14,1 Hz; 1H; H-7'); 3,05 (m; 0,5H, H-8); 3,36 (dd; J = 16,6; 13,4 Hz; 1H, H-6); 3,65 (s, 1H, H-6'); 3,75 (s, 1,5H, H-1); 3,77 (s, 1,5H, H-1'); 3,87 (m, 3H, H-8', H-11); 4,18 (t, J = 6,2 Hz; 0,5H, H-15); 4,23 (t; J = 3,2 Hz; 0,5H, H-15'); 4,46 (m, 1H, H-14); 4,79 (td; J = 3,2; 11,0 Hz; 1H, H-14'); 6,81 (dd; J = 8,6; 11,4 Hz, 2H, H-4); 7,06 (d, J = 8,6 Hz; 1H, H-3); 7,22 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-3'); 7,27 (dt, J = 1,0; 7,4 Hz, 1H, H-18); 7,33 (t, J = 7,4 Hz; 1H, H-18'); 7,40 (t, J = 7,4 Hz; 1H, H-19); 7,42 (t, J = 7,4 Hz; 1H, H-19'); 7,50 (d, J = 7,4 Hz; 1H, H-17); 7,55 (d, J = 7,4 Hz, H-17'); 7,75 (d, J = 7,4 Hz; 1H, H-20); 7,82 (d, J = 7,4 Hz; 1H, H-20'); 7,96 (br s, 1H, H-12) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 19,99; 20,50 (C-9); 32,56; 33,07 (C-7); 36,04; 36,07 (C-6) 46,96; 47,06 (C-15); 48,19; 49,80 (C-11); 55,31 (C-1); 55,41; 55,95 (C-8) 67,45; 67,92 (C-14); 114,11; 114,17 (C-4); 117,39; 117,66 (C-10); 120,08; 120,26 (C-17); 124,26; 124,29; 124,78 (C-18); 127,13; 127,58; 127,65 (C-19); 127,83; 128,12; 128,19 (C-20); 129,51 (C-5); 129,87; 130,02 (C-3); 141,41; 141,33 (C-21); 143,44; 143,48; 143,59 (C-16); 154,84; 155,28 (C-13); 158,85; 158,90 (C-2); 174,24 (C-13) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 516,1719; gefunden: 516,1717.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

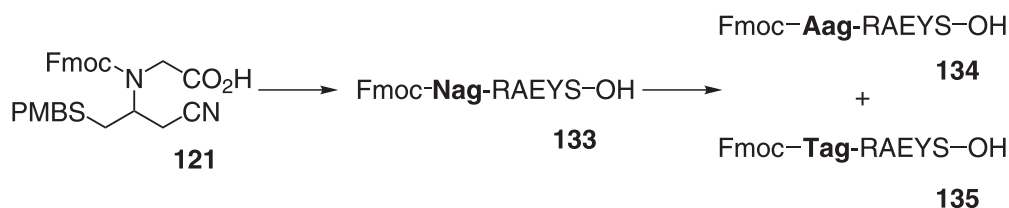
2-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-cyano-3-(ethyldisulfanyl)propan-2-yl)-amino)essigsäure (Fmoc-Nag(SET)-OH) (**121**):



2-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(1-cyano-3-(4-methoxybenzylthio)propan-2-yl)amino)essigsäure (**120**) (2,25 g; 4,36 mmol) und TES (0,7 ml; 4,36 mmol) wurden in TFA (15 ml) gelöst. Nach 30 min Rühren wurde die Säure entfernt und der Rückstand in DMF (20 ml) aufgenommen. Der Lösung wurden Diethyldisulfid (2,2 ml; 2,1 g; 17,44 mmol) und N-Methylmorpholin (9,6 ml; 8,8 g; 87,2 mmol) zugesetzt und das Gemisch 24 Stunden lang bei RT gerührt. Die Lösung wurde danach auf 0 °C gekühlt, vorsichtig mit Salzsäure (1 M) neutralisiert und danach mit EtOAc (3x 50 ml) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit Wasser und NaCl-Lsg. (gesättigt) (je 100 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (mobile Phase: CH₂Cl₂/MeOH) gereinigt, wobei das Produkt nach Evaporation des Lösungsmittels als braunes Öl isoliert werden konnte. cis-trans-Isomerengemisch (1 : 1 auf Basis von ¹H-NMR). Ausbeute: 0,8 mmol; 0,35 g; 18 %. Summenformel: C₂₃H₂₄N₂O₄S₂ (456,58 g · mol⁻¹). R_f-Wert: 0,5 (CH₂Cl₂:MeOH:Ameisensäure = 10:1:0,02). Schmelzpunkt: 145 °C. ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 25 °C): δ = 1,22 (t, J = 7,3 Hz; 1,5H, H-1); 1,31 (t, J = 7,3 Hz; 1,5H, H-1'); 1,90 (dd, J = 6,4; 14,0 Hz; 0,5H, H-5); 1,93 (d, J = 7,3 Hz; 1H, H-3); 2,21 (dd, J = 6,4; 14,0 Hz; 0,5H, H-5'); 2,53 (q, J = 7,3 Hz; 1H, H-2); 2,69 (q, J = 7,3 Hz; 1H, H-2'); 3,00 (dd, J = 9,4; 14,0 Hz; 0,5H, H-5''); 3,02 (d, J = 7,3 Hz; 1H, H-3'); 3,18 (dd, J = 6,9; 14,0 Hz; 0,5H, H-5'''); 3,45 (m, 0,5H, H-4); 4,02 (m, 2,5H, H-4', H-7); 4,20 (t, J = 6,1 Hz; 0,5H, H-11); 4,25 (t, J = 3,2 Hz; 0,5H, H-11'); 4,49 (d, J = 6,1 Hz; 1H, H-10); 4,82 (d, J = 3,2 Hz; 1H, H-10); 7,38 (m, 4H, H-15, H-16); 7,55 (m, 2H, H-14); 7,78 (m, 2H, H-17) ppm. ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz, 25 °C): δ = 14,14; 14,25 (C-1); 19,35; 20,14 (C-5); 31,76; 32,11 (C-2); 37,99; 38,61 (C-3); 46,88; 47,07 (C-11); 49,57; 50,75 (C-7); 55,79; 56,36 (C-4); 67,47; 67,72 (C-10); 117,41; 117,72 (C-6); 120,06; 120,20; 120,24 (C-17); 124,21; 124,24; 124,74 (C-14); 127,11; 127,80; 127,63 (C-15); 127,74; 128,15; 128,23 (C-16); 141,34 (C-12); 143,42; 143,58 (C-13); 154,62; 155,24 (C-9); 172,97; 173,23 (C-8) ppm (Die Signalzuordnung basiert auf mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie). ESI-HRMS: berechnet: 456,1177; gefunden: 456,1176.

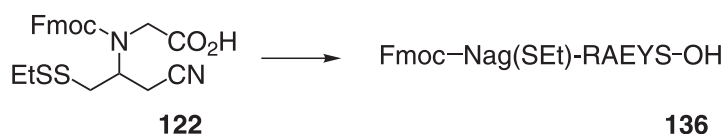
6.3.3 Synthese der Peptide

Fmoc-Aag-RAEYS-OH (**134**) / Fmoc-Tag-RAEYS-OH (**135**):



Mit der Sequenz Fmoc-Arg(Pbf)AlaGlu(*t*Bu)Tyr(*t*Bu)Ser(*t*Bu) vorbelad. Wangharz (230 mg) wurde in DMF gequollen. Danach wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x CH₂Cl₂, 5x DMF; je 1 ml) und für 10 min mit Piperidin/DMF (1:4; 1 ml) behandelt (Fmoc-Bestimmung 0,34 μmol/mg; entspricht 78 μmol Peptid). Anschließend wurde das Harzes (5x DMF, 5x CH₂Cl₂, 5x DMF; je 1 ml) gewaschen. Die Lösung von Fmoc-Nag(PMB)-OH (**121**) (151 mg; 290 μmol), PyBOP (120 mg; 290 μmol) und NMM (64 μl; 580 μmol) in DMF (1,5 ml) wurde mit dem Harz gemischt und dieses anschließend für 1 Stunde geschüttelt. Danach wurde gewaschen (5x DMF, 10x CH₂Cl₂; je 1 ml) und dem Harz zur Ablösung des Peptides ein Gemisch von TFA, TES und Thioanisol (92:4:4; 1,5 ml) beigegen. Nach Ablauf von 2 Stunden wurde die Entschützungslösung vom Harz getrennt und dieses mit TFA (2x 300 μl) extrahiert. Die vereinigten TFA-Lösungen wurden dann bis auf 500 μl eingengt und das Peptid durch Zugabe von Diethylether gefällt. Das ausgefallene Peptid wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat noch zweimal mit Diethylether resuspendiert. Das Peptid wurde dann in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (6 ml; H₂O:CH₃CN = 2:1) gelöst und für die Dauer von 3 Tagen in Lösung belassen. Nach Ablauf dieser Zeit konnte bei der HPLC-Untersuchung kein Fmoc-Nag-RAEYS-OH mehr gefunden werden und es erfolgte die präparative Reinigung. Die analytischen Daten befinden sich in Tabelle 6.2.

Fmoc-Nag(SET)-RAEYS-OH (**136**):

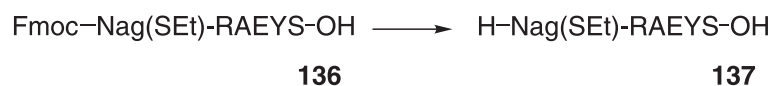


Mit der Sequenz Fmoc-Arg(Pbf)AlaGlu(*t*Bu)Tyr(*t*Bu)Ser(*t*Bu) vorbelad. Wangharz (230 mg) wurde in DMF gequollen. Danach wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x CH₂Cl₂, 5x DMF; je 1 ml) und für 10 min mit Piperidin/DMF (1:4; 1 ml) behandelt (Fmoc-Bestimmung 0,34 μmol/mg; entspricht 34 μmol Peptid). Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x CH₂Cl₂, 5x DMF; je 1 ml). Fmoc-Nag(SET)-OH (**122**) (47 mg, 100 μmol), HCTU (33 mg, 90 μmol) und NMM (25 μl, 200 μmol.) wurden in DMF (1 ml) gelöst und bei 25 °C inkubiert. Nach

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1

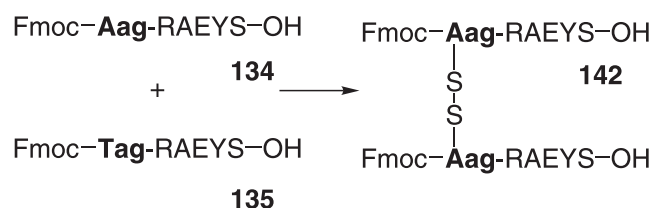
Ablauf von 5 Minuten wurde Lösung des aktivierten Auxiliaraminosäurebausteines mit dem Peptidylharz gemischt und für 60 Minuten geschüttelt. Nach dem sich anschließenden Waschen (5x DMF, 10x CH₂Cl₂; je 1 ml) des Harzes wurde ein Gemisch von TFA, TES und Thioanisol (92:4:4; 1 ml) zur Ablösung des Peptides zum Harz gegeben und für eine Dauer von 2 Stunden geschüttelt. Die Entschützungs-lösung wurde danach direkt mit Diethylether (10 ml) vermischt. Das Harz wurde noch zweimal mit TFA (0,3 ml) extrahiert und die Extrakte ebenfalls mit Diethylether (10 ml) vermischt. Nach Zentrifugation wurde die überstehende Lösung abdekantiert und das präzipitierte Peptid mit Diethylether resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach zweimaliger Wiederholung wurde das Peptid in Wasser und Acetonitril (2:1; 1 ml) gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die analytischen Daten befinden sich in Tabelle 6.2.

H-Nag(SET)-RAEYS-OH (**137**):



Der Lösung des Peptides Fmoc-Nag(SET)-RAEYS-OH (**136**) (4,5 mg; 4,2 μ mol) in Wasser (400 μ l) und CH₃CN (200 μ l) wurde eine Lösung von Piperidin (100 μ l) in Wasser (500 μ l) zugefügt und das Gemisch dann für 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Danach wurde unter Eiskühlung langsam mit einer Lösung von Ameisensäure (40 μ l) in Wasser (200 μ l) angesäuert und das Produktpeptid anschließend mit Hilfe präparativer HPLC isoliert. Die analytischen Daten befinden sich in Tabelle 6.2.

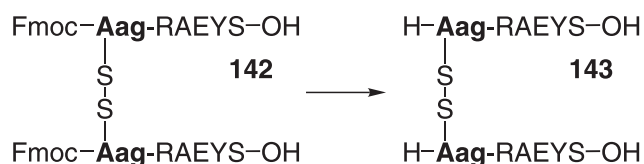
[Fmoc-Aag(S-)-RAEYS-OH]₂ (**142**) (symmetrisches Disulfid):



Eine Lösung des Gemisches der Peptide Fmoc-Aag-RAEYS-OH (**134**) und Fmoc-Tag-RAEYS-OH (**135**) (300 μ l; 6,3 mM) wurden in einem FalconTM Gefäß (Volumen 10 ml) mit Ammoniak-Lösung (300 μ l; 20 %ig) gemischt. Das Gefäß wurde verschlossen und durch den Deckel eine Kanüle zum Einleiten von Druckluft gestochen, deren Spitze sich in der Peptidlösung befand. Der Druckausgleich wurde durch Perforation des Deckels mit einer weiteren Kanüle gewährleistet, die jedoch nicht in die Lösung eintauchte. Danach wurde Druckluft angelegt, wobei ein minimaler Fluss gewählt wurde, dem die Lösung für die Dauer von 8 Stunden ausgesetzt wurde. Die Lösung wurde dann lyophilisiert und der Rückstand in Wasser,

Acetonitril und Ameisensäure (10:3:1; 1 ml) gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die reinen Produktfraktionen wurden in Wasser (180 μ l) und CH₃CN (60 μ l) gelöst und die Konzentration basierend auf der Fmoc-Monitoring-Methode bestimmt (Abschnitt 6.1.11). Die analytischen Daten befinden sich in Tabelle 6.2.

[H-Aag(S-)-RAEYS-OH]₂ (**143**) (symmetrisches Disulfid):



Eine Lösung des Fmoc-geschützten symmetrischen Disulfides (**142**) in H₂O und CH₃CN (3:1; 0,2 ml; Konzentration des Peptides: 0,72 mM) wurde mit einem Gemisch aus Wasser, CH₃CN und Piperidin (2:1:0,6; 0,2 ml) vermischt. Die Lösung wurde 20 min bei 25 °C geschüttelt und dann unter Eiskühlung Ameisensäure (50 μ l) zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung bis auf ein Volumen von 0,1 ml eingeeengt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die analytischen Daten befinden sich in Tabelle 6.2.

Table 6.2: Analytische Daten der Peptide für die auxiliar-vermittelte Ligation (**134** - **137**, **142**, **143**).

Bez.	Sequenz	Ausbeute [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\%$]	MW [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]	Summenformel	HPLC	Grad.	MALDI-TOF-MS	
					t_R [min]		ber.	gef.
134	Fmoc- Aag -RAEYS-OH	25,6/26,1/33	1024,40	$\text{C}_{47}\text{H}_{60}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}_1$	21,4	3	1021,40	1021,48
135	Fmoc- Tag -RAEYS-OH	23,7/23,8/30	1003,37	$\text{C}_{47}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_1$	23,4	3	1004,38	1004,57
136	Fmoc- Nag (SEt)-RAEYS-OH	6,2/6,6/18	1062,39	$\text{C}_{49}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}_2$	22,5	3	1063,40	1063,43
137	H- Nag (SEt)-RAEYS-OH	3,6/3,0/86	840,33	$\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}_2$	20,2; 20,3	1	840,33	840,20
142	[Fmoc- Aag (S-)-RAEYS-OH] ₂	0,2/0,4/9	2038,79	$\text{C}_{94}\text{H}_{118}\text{N}_{20}\text{O}_{28}\text{S}_2$	24,0	3	2039,79	2039,30
143	[H- Aag (S-)-RAEYS-OH] ₂	0,1/0,2/78	1594,65	$\text{C}_{64}\text{H}_{98}\text{N}_{20}\text{O}_{24}\text{S}_2$	16,1	2	1595,66	1595,62

6.3.4 Auxiliar-vermittelte Ligation

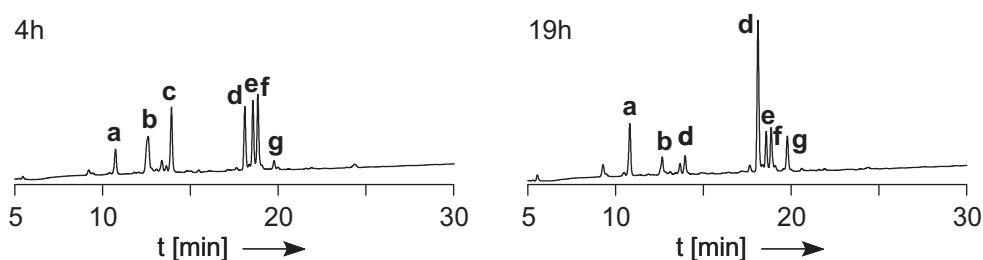


Abbildung 6.1: Auxiliar-vermittelte Ligation. HPLC nach 4 und 19 Stunden (Gradient 1; $\lambda = 220$). Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befinden sich in Tabelle 6.3.

Die Fragmentverknüpfung wurde unter Verwendung von Ligationspuffer A durchgeführt. Der Puffer (60 μl) wurden mit der Stammlösung des symmetrischen Disulfides (**143**) (2,5 mM; 15 μl) und der Stammlösung des Peptidthioesters H-LYKAG-SPAA (**140**) (10 mM; 7,5 μl) vermischt und bei 25 °C für die Dauer von 24 Stunden geschüttelt. Nach Zugabe von TFA (15 μl) wurden die Reaktionskomponenten mittels semi-präparativer HPLC getrennt.

Tabelle 6.3: Zuordnung der Reaktionskomponenten aus Abb. 6.1.

Bez.	Sequenz	MW [g · mol ⁻¹]	Summenformel	
a	H-GRAEYS-OH (125)	681,69	C ₂₈ H ₄₃ N ₉ O ₁₁	
b	H-Aag-RAEYS-OH (144)	798,86	C ₃₂ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₂ S ₁	
c	H-LYKAG-SPAA (140)	674,82	C ₂₈ H ₄₆ N ₆ O ₉ S ₂	
d	H-LYKAG- Aag (MESA)-RAEYS-OH (147)	1471,68	C ₆₀ H ₉₄ N ₁₆ O ₂₁ S ₃	
e	H-LYKAG- Aag -RAEYS-OH (146)	1331,50	C ₅₈ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₈ S ₁	
f	H-LYKAG-ent- Aag -RAEYS-OH (<i>ent</i> - 146)	1331,50	C ₅₈ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₈ S ₁	
g	H-LYKAG- Tag -RAEYS-OH (148)	1313,47	C ₅₈ H ₈₇ N ₁₅ O ₁₈ S	
Bez.	Sequenz	HPLC <i>t_R</i> [min]	MALDI-TOF-MS	
			ber. [M+H] ⁺	gef.
a	H-GRAEYS-OH (125)	10,8	682,3	682,1
b	H-Aag-RAEYS-OH (144)	12,5	799,3	799,4
c	H-LYKAG-SPAA (140)	13,9	675,3	675,5
d	H-LYKAG- Aag (MESA)-RAEYS-OH (A7)	18,2	1471,6	1471,8
e	H-LYKAG- Aag -RAEYS-OH (146)	18,6	1331,6	1331,3
f	H-LYKAG-ent- Aag -RAEYS-OH (<i>ent</i> - 146)	18,9	1331,6	1331,3
g	H-LYKAG- Tag -RAEYS-OH (148)	19,8	1314,6	1314,6

6.3.5 Abspaltung des Auxiliars

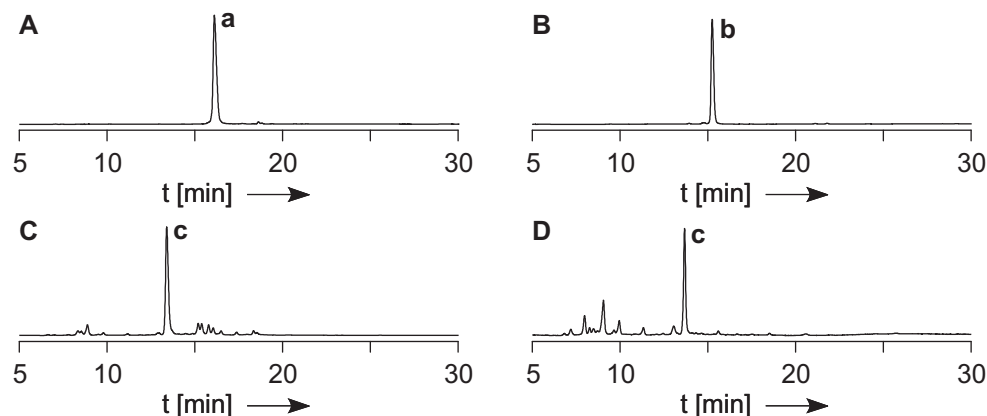


Abbildung 6.2: Abspaltung des Auxiliars. **A:** Edukt: H-LYKAG-**Tag**-RAEYS-OH **148** (**a**); **B:** Edukt: H-LYKAG-**Aag**(MESA)-RAEYS-OH **147** (**b**); **C:** Rohchromatogramm der Reaktion von **148** ($t = 1$ h; 75 %) Reaktionsprodukt H-LYKAGGRAEYS-OH **149** (**c**); **D:** Rohchromatogramm der Reaktion von **147** ($t = 2,5$ h; 51 %) Reaktionsprodukt H-LYKAGGRAEYS-OH **149** (**c**). (Grad. 2; $\lambda = 220$). Zuordnung/Analytik der Reaktionskomp. befinden sich in Tabelle 6.4.

Die Abspaltung des Auxiliars wurde anhand des unsymmetrischen Disulfides **147** und des Thiolactons **148** untersucht (Abb. 6.2 und Tab. 6.4). Das lyophilisierte Peptid wurde in entgastem Abspaltpuffer A gelöst ($30 \mu\text{l}$; $0,5 \text{ mM}$). Die Lösung wurde bei 80°C für $2,5 \text{ h}$ (**147**) bzw. 1 h (**148**) inkubiert, dann durch Zugabe von TFA ($5 \mu\text{l}$) wurde die Reaktion beendet und mit Wasser ($65 \mu\text{l}$) verdünnt. Die so vorbereitete Probe wurde mittels HPLC untersucht. Die Berechnung der Ausbeute basiert auf quantitativer HPLC. Dazu wurde eine HPLC-Spur des Eduktpeptides

Tabelle 6.4: Zuordnung der Reaktionskomponenten aus Abb. 6.2.

Bez.	Sequenz	MW [g · mol ⁻¹]	Summenformel	
a	H-LYKAG- Tag -RAEYS-OH (148)	1313,47	C ₅₈ H ₈₇ N ₁₅ O ₁₈ S	
b	H-LYKAG- Aag (MESA)-RAEYS-OH (147)	1471,68	C ₆₀ H ₉₄ N ₁₆ O ₂₁ S ₃	
c	H-LYKAGGRAEYS-OH (149)	1214,32	C ₅₄ H ₈₃ N ₁₅ O ₁₇	
Bez.	Sequenz	HPLC t_R [min]	MALDI-TOF-MS ber. [M+H] ⁺	gef.
a	H-LYKAG- Tag -RAEYS-OH (148)	16,1	1314,6	1314,6
b	H-LYKAG- Aag (MESA)-RAEYS-OH (147)	15,2	1471,6	1471,8
c	H-LYKAGGRAEYS-OH (149)	14,0	1214,6	1214,9

in der in der Reaktion verwendete Menge aufgenommen und diese mit der HPLC-Spur der Reaktion in Beziehung gesetzt.

6.4 Synthese von Peptidthioestern

Die Synthese der Peptidthioester **140** - **194**, **224** ($\varepsilon_{280} = 1280 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Tab. 6.5) erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift zur manuelle Peptidfestphasensynthese nach der Boc/Z-Strategie (Abschnitt 6.2.2) an einem MBHA (Beladungsgrad $800 \mu\text{mol/g}$). Außer im Falle von **140** erfolgte dabei zunächst eine Erstbeladung mit Fmoc-Gly-OH und im Anschluss wurde S-Trt-geschützte Mercaptopropionsäure gekuppelt. Vor der Abspaltung des Histidinpeptidthioesters wurde das Festphasensyntheseharz zur Entfernung der Histidin-DNP-Seitenketenschutzgruppe mit 20 äq. Thiophenol behandelt.

Die Synthese der Benzylthioester **161**, **164** und **225** (Tab. 6.5) erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidfestphasensynthese nach der Fmoc/tBu-Strategie (Abschnitt 6.2.3) an einem mit Fmoc-Gly-OH vorbeladenen 4-Sulfamylbutyrylharz (Beladungsgrad $200 \mu\text{mol/g}$).

Table 6.5: Analytische Daten der Thioesterpeptide **140**, **161**, **164**, **167**, **168**, **170**, **140**, **194**, **224** und **225**.

Bez. Sequenz	Ansatz- größe [μmol]	OD ₂₈₀	Ausbeute [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\%$]	MW [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]	Summenformel	HPLC t_R [min]	Grad. ber.	MALDI-TOF-MS gef. [$\text{M}+\text{H}]^+$
140 H-LYKAG-SPA A	10	0,500	7,8/4,9/78	637,79	C ₂₉ H ₄₇ N ₇ O ₇ S ₁	13,1	2	638,3 638,5
161 Ac-TLQNREHETNG-SBn	10	–	1,3/1,8/13	1446,54	C ₆₀ H ₉₁ N ₁₉ O ₂₁ S ₁	17,0	3	1446,7 1447,1
164 Ac-LKKPFNRPQG-SBn	10	–	2,5/3,3/25	1332,61	C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₁	19,3	3	1332,7 1333,1
167 H-LYKAH-SPAAG	10	0,404	6,3/4,9/63	774,93	C ₃₅ H ₅₄ N ₁₀ O ₈ S ₁	11,1	2	775,4 775,4
168 H-LYKAM-SPAAG	10	0,615	4,8/3,7/48	768,99	C ₃₄ H ₅₆ N ₁₀ O ₈ S ₂	13,8	3	769,2 769,4
170 H-LYKAL-SPAAG	25	0,406	6,3/4,6/25	750,95	C ₃₅ H ₅₈ N ₈ O ₈ S ₁	15,7	3	751,4 751,4
194 H-LYRAG-SPAAG	50	0,692	27,0/19,5/54	722,90	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₈ S ₁	12,0	4	722,4 723,5
224 H-KFSYLPFIPTRG-SPAAG	10	0,577	4,5/7,1/45	1569,87	C ₇₅ H ₁₁₂ N ₁₈ O ₁₇ S ₁	15,8	4	1569,8 1570,1
225 Ac-YQQTGRAFRDG-SEt	10	0,384	3,0/3,8/30	1294,28	C ₅₂ H ₈₃ N ₁₉ O ₁₈ S ₁	11,1	4	1294,7 1294,3

6.5 Versuche zu Kapitel 4.2:

Native Chemische Ligation mit Valin

6.5.1 Synthese der Peptide

Die Synthese der Peptide **152**, **154**, **159**, **160**, **162**, **163**, **169**, **172**, **176** und **179**. (**152**, **159**: $\varepsilon_{280} = 1280 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; **154**, **160**, **169**, **172**, **176** und **179**: $\varepsilon_{280} = 2560 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Tab. 6.6) erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidfestphasensynthese nach der Fmoc/tBu-Strategie (Abschnitt 6.2.3) an einem NovaSyn TGR-Harz (Beladungsgrad $200 \mu\text{mol/g}$). Die Peptide H-PenAKSDQKQEQ-L-NH₂ (**162**), H-PenQPKTGPFEDLK-NH₂ (**163**) und H-PenRAEYS-NH₂ (**152**) wurden mit Boc-Pen(Trt)-OH als terminalem Baustein synthetisiert.

6.5.2 Ligationen

Die Durchführung der Ligationen erfolgte unter Verwendung der Allgemeinen Vorschrift für die Ligationen mit Penicillaminpeptiden (6.2.5). Chromatogramme der Ligation: Abb. 6.3 bis 6.8. Zuordnung der Reaktionskomponenten Tab. 6.7 und 6.8.

6.5.3 Entschwefelung

Die Peptide H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ **154** und Syk-Kinase Segment (103 – 124) **166** wurden entsprechend der Vorschrift zur metall-basierten Entschwefelung (Abschnitt 6.2.6) behandelt. Die Peptide H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ **154**, H-LYKAHPenRAEYS-NH₂ **172**, H-LYKAMPenRAEYS-NH₂ **176**, H-LYKALPenRAEYS-NH₂ **179**, das STAT-1 Segment (176 – 197) **165** und das Syk-Kinase Segment (103 – 124) **166** wurden entsprechend der Vorschrift zur metall-freien Entschwefelung (Abschnitt 6.2.6) in entgastem Wasser gelöst und mit allen beschriebenen Reaktionszusätzen gemischt. Chromatogramme der Entschwefelungsreaktion: Abb. 6.9 bis 6.12. Zuordnung der Reaktionskomponenten Tab. 6.9.

Table 6.6: Analytische Daten der Pencillaminpeptide **152, 154, 159, 160, 162, 163, 169, 172, 176** und **179**.

Bez. Sequenz	Ansatz- größe [μmol]	OD ₂₈₀	Ausbeute [$\mu\text{mol}/\text{mg}/\%$]	MW [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]	Summenformel	HPLC t_R [min]	Grad. ber. gef.	MALDI-TOF-MS [M+H] ⁺
152 H-PenRAEYS-NH ₂	10	0,359	5,6/4,2/56	754,85	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₁	12,6	2	755,4 755,2
154 H-LYKAGPenRAEYS-NH ₂	10	0,348	6,8/8,7/68	1287,49	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	13,5	2	1287,7 1288,0
159 H-VRAEYS-NH ₂	5	0,498	3,9/2,8/78	722,79	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀	12,3	2	723,3 722,8
160 H-LYKAGVRAEYS-NH ₂	1	0,133	0,3/0,3/26	1255,42	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆	13,1	2	1255,7 1255,6
162 H-PenAKSDQKQEQI-NH ₂	10	–	7,2/9,4/72	1304,47	C ₅₃ H ₈₃ N ₁₇ O ₁₉ S ₁	10,0	3	1304,7 1304,7
163 H-PenQPKTGPFEDLK-NH ₂	10	–	6,8/9,4/68	1389,62	C ₆₂ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₈ S ₁	15,6	3	1389,7 1390,1
169 H-LYKA α MPenRAEYS-NH ₂	5	0,585	2,3/3,1/45	1361,63	C ₆₀ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₂	16,2	3	1361,7 1362,0
172 H-LYKAHPenRAEYS-NH ₂	5	0,512	2,0/2,8/39	1367,57	C ₆₁ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₆ S ₁	17,5	2	1367,7 1368,2
176 H-LYKAMPenRAEYS-NH ₂	5	0,282	1,1/1,5/22	1361,63	C ₆₀ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₂	15,4	3	1361,7 1361,8
179 H-LYKALPenRAEYS-NH ₂	5	0,256	1,0/1,4/10	1343,59	C ₆₁ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	15,3	3	1343,7 1343,3

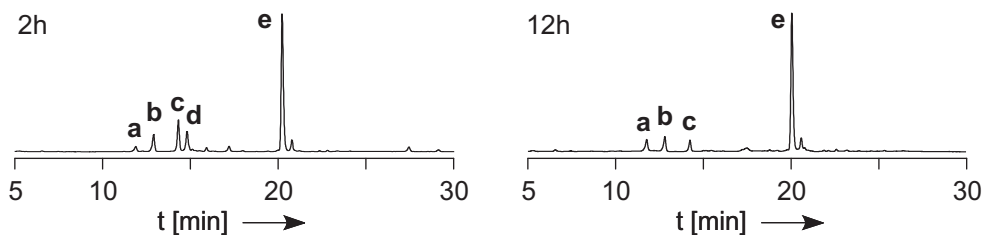


Abbildung 6.3: Verknüpfung von H-LYKAG-SR **140** und H-PenRAEYS-NH₂ **152**: HPLC-Analytik nach 2 und 12 Stunden; Bedingungen: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$ (Gradient 1; $\lambda = 280\text{ nm}$). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.7.

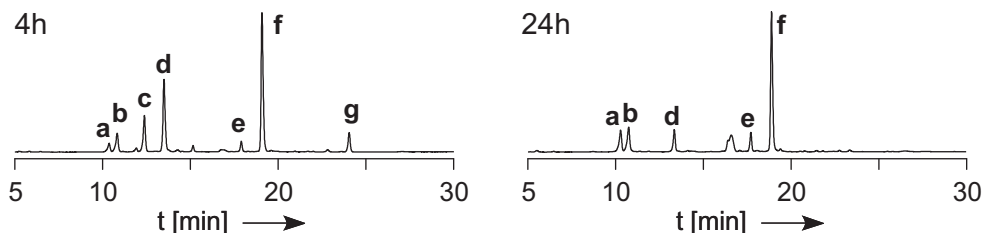


Abbildung 6.4: Verknüpfung von H-LYKAH-SR **167** und H-PenRAEYS-NH₂ **152**: HPLC-Analytik nach 4 und 24 Stunden; Bedingungen: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$ (Gradient 2; $\lambda = 280\text{ nm}$). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.7.

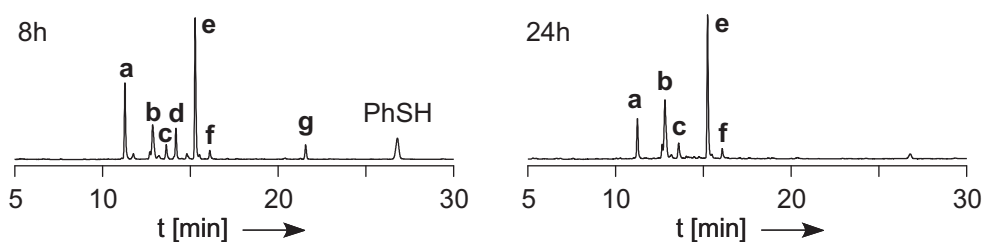


Abbildung 6.5: Verknüpfung von H-LYKAM-SR **168** und H-PenRAEYS-NH₂ **152**: HPLC-Analytik nach 8 und 24 Stunden; Bedingungen: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$ (Gradient 3; $\lambda = 280\text{ nm}$). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.7.

Tabelle 6.7: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen von H-PenRAEYS-NH₂ mit H-LYKAG/H/M-SR

Bez.	Sequenz	MW [g · mol ⁻¹]	Summenformel	HPLC t _R [min]	MALDI-TOF-MS berechnet [M+H] ⁺	gefunden
Ligation von H-LYKAG-SPAAG 140 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152 (Abb. 6.3)						
a	H-LYKAG-NH ₂ (157)	549,33	C ₂₆ H ₄₃ N ₇ O ₆	11,8	550,3	550,4
b	H-LYKAG-OH (158)	550,65	C ₂₆ H ₄₂ N ₆ O ₇	12,8	551,3	551,3
c	H-PenRAEYS-NH ₂ (152)	754,85	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₁	14,2	755,4	755,2
d	H-LYKAG-SPAAG (140)	637,79	C ₂₉ H ₄₇ N ₇ O ₇ S ₁	14,7	638,3	638,5
e	H-LYKAGPenRAEYS-NH ₂ (154)	1287,49	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	20,2	1287,7	1287,7
Ligation von H-LYKAH-SPAAG 167 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152 (Abb. 6.4)						
a	H-LYKAH-NH ₂ (171)	629,75	C ₃₀ H ₄₇ N ₉ O ₆	10,3	630,4	630,3
b	H-LYKAH-OH (172)	630,74.	C ₃₀ H ₄₆ N ₈ O ₇	10,5	631,4	631,6
c	H-LYKAH-SPAAG (167)	774,93	C ₃₅ H ₅₄ N ₁₀ O ₈ S ₁	12,2	775,4	775,4
d	H-PenRAEYS-NH ₂ (152)	754,85	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₁	13,3	755,4	755,2
e	H-LYKA α HPenRAEYS-NH ₂ (173)	1367,57	C ₆₁ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₆ S ₁	18,0	1367,7	1367,6
f	H-LYKAHPenRAEYS-NH ₂ (172)	1367,57	C ₆₁ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₆ S ₁	19,0	1367,7	1367,7
g	H-LYKAH-SPH (174)	722,90	C ₃₆ H ₅₀ N ₈ O ₆ S ₁	23,6	723,4	723,3
Ligation von H-LYKAM-SPAAG 168 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152 (Abb. 6.5)						
a	H-PenRAEYS-NH ₂ (152)	754,85	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₁	10,8	755,4	755,2
b	H-LYKAM-OH (175)	624,79.	C ₂₉ H ₄₈ N ₆ O ₇ S ₁	12,5	625,3	625,2
c	H-LYKAM-NH ₂	623,81	C ₂₉ H ₄₉ N ₇ O ₆ S ₁ s.o.	13,5	624,4	624,2
d	H-LYKAM-SPAAG (168)	768,99	C ₃₄ H ₅₆ N ₁₀ O ₈ S ₂	13,8	769,2	769,4
e	H-LYKAMPenRAEYS-NH ₂ (176)	1361,63	C ₆₀ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₂	15,0	1361,7	1261,1
f	H-LYKA α MPenRAEYS-NH ₂ (169)	1361,63	C ₆₀ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₂	15,8	1361,7	1361,8
g	H-LYKAM-SPH (177)	716,95	C ₃₅ H ₅₄ N ₆ O ₆ S ₂	21,3	717,4	717,6

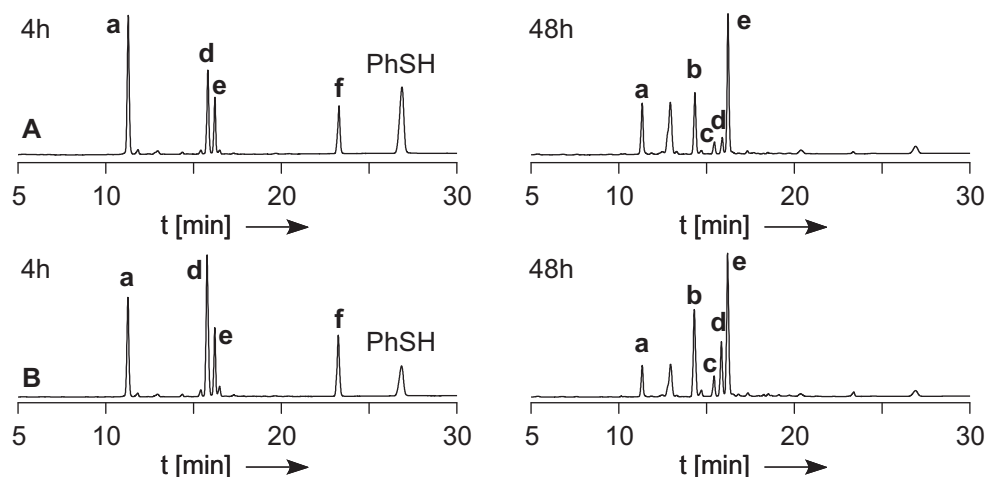


Abbildung 6.6: Verknüpfung von H-LYKAL-SR **170** und H-PenRAEYS-NH₂ **152**: HPLC-Analytik nach 4 und 48 Stunden; Bedingungen : T = 37 °C, pH = 8,5 **A**: 1 äq. H-LYKAL-SR; **B**: 2 äq. H-LYKAL-SR. Nach 24 Stunden wurde erneut der Reduktionspuffer B oder C (16 % des Anfangsvolumens) und 1,6 Vol-% Thiophenol zugesetzt. (Gradient 3; λ = 280 nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.8.

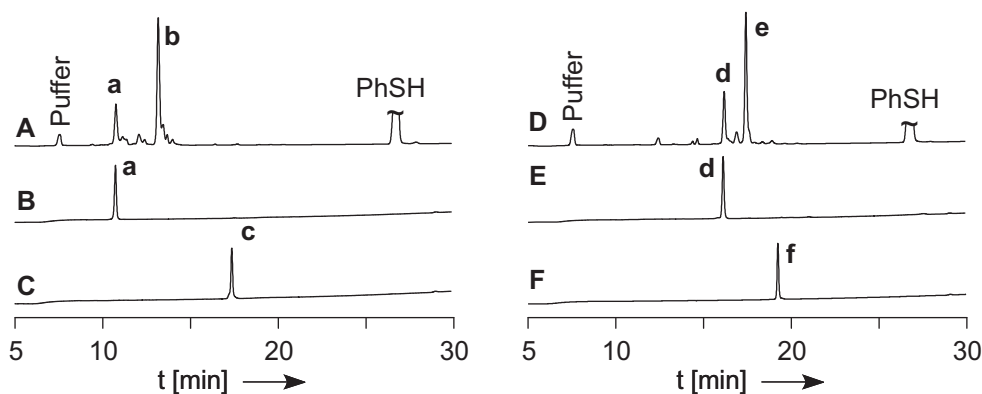


Abbildung 6.7: Herstellung des STAT-1 Segmentes 176–197 **165** (**A** – **C**) und des Syk-Kinase Segmentes 103 – 124 **166** (**D** – **F**). **A**: Ligation von Ac-TLQNREHETNG-SBn **161** (1,0 äq.) und H-PenAKSDQKQEQL-NH₂ **162** (1,4 äq.) nach 24 h. Ausbeute: 78 % **B**: Vgl. **162**; **C**: Vgl. **161**; **D**: Ligation von Ac-LKKPFNRPQG-SBn **164** (1,0 äq.) und H-PenQPKTGPFEDLK-NH₂ **163** (1,3 äq.) nach 24 h; **E**: Vgl. **163**; **F**: Vgl. **164**. Nach 24 Stunden wurden die Reaktionen durch Zugabe von TFA (10 μ l) gestoppt. Reaktionsbedingungen: T = 37 °C, pH = 8,5 (HPLC-Bedingungen: Grad. 3; λ = 222 nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.8.

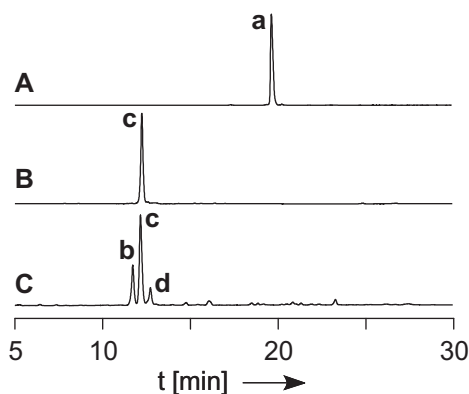


Abbildung 6.8: Kontrollexperiment – Reaktion von H-LYKAG-SR (**140**) und H-VRAEYS-NH₂ (**159**). **A:** Putatives Verknüpfungsprodukt H-LYKAGVRAEYS-NH₂; **B:** Vergleichschromatogramm **159**; **C:** Chromatogramm nach 48 h Reaktionszeit. Reaktionsbedingungen: T = 37 °C, pH = 8,5 (HPLC-Bedingungen: Gradient 1; λ = 280 nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.8.

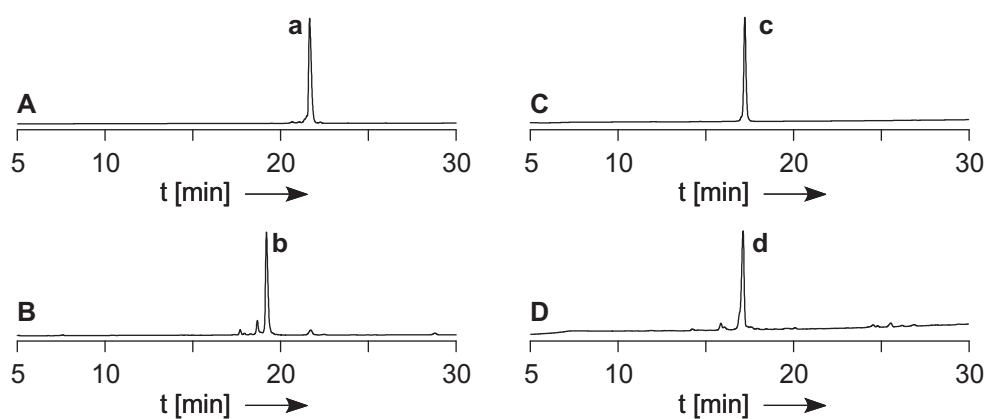


Abbildung 6.9: Metall-basierte Entschwefelung von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ (**A**, **B**) und dem Syk-Kinase Segmentes (103–124) (**C**, **D**). **A:** Chromatogramm von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ (**154**); **B:** Entschwefelung von **154** nach 8 Stunden; **C:** Chromatogramm von Ac-LKKPFNRPQGPenQPKTGPFEDLK-NH₂ (**166**); **D:** Entschwefelung von **166** nach 8 Stunden. (HPLC-Bedingungen: **A**, **B:** Gradient 1; λ = 280 nm; **C**, **D:** Gradient 3; λ = 222 nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.9.

Tabelle 6.8: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen von H-PenRAEYS-NH₂ mit H-LYKAL-SR, für die Herstellung des STAT-1 Segmentes 176–197 und des Syk-Kinase Segmentes 103 – 124 und des Kontrollexperimentes

Bez.	Sequenz	MW [g · mol ⁻¹]	Summenformel	HPLC t _R [min]	MALDI-TOF-MS berechnet [M+H] ⁺	gefunden
Ligation von H-LYKAL-SPAAG 170 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152 (Abb. 6.6)						
a	H-PenRAEYS-NH ₂ (152)	754,85	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₁	11,3	755,4	755,2
b	H-LYKAL-OH (178)	606,75	C ₃₀ H ₅₀ N ₆ O ₇	14,4	607,4	607,5
c	H-LYKAL-NH ₂	605,77	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀ S ₁	15,3	606,4	606,4
d	H-LYKAL-SPA A (170)	637,79	C ₂₉ H ₄₇ N ₇ O ₇ S ₁	15,4	638,3	638,5
e	H-LYKALPenRAEYS-NH ₂ (179)	1343,59	C ₆₁ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	16,3	1287,7	1287,7
f	H-LYKAL-SPh (180)	698,92	C ₃₆ H ₅₄ N ₆ O ₆ S ₁	23,0	699,4	699,4
Herstellung des STAT-1 Segmentes 176–197 165 (Abb. 6.7 (A – C))						
a	H-PenAKSDQKQEQL-NH ₂ (162)	1304,47	C ₅₃ H ₉₃ N ₁₇ O ₁₉ S ₁	10,0	1304,7	1304,7
b	Ac-TLQNREHETNGPen AKSDQKQEQL-NH ₂ (165)	2626,81	C ₁₀₆ H ₁₇₆ N ₃₆ O ₄₀ S ₁	13,0	2626,3	2627,1
c	Ac-TLQNREHETNG-SBn (161)	1446,54	C ₆₀ H ₉₁ N ₁₉ O ₂₁ S ₁	17,0	1446,7	1447,1
Herstellung des Syk-Kinase Segmentes 103 – 124 166 (Abb. 6.7 (D – F))						
d	H-PenQPKTGPFFEDLK-NH ₂ (163)	1389,62	C ₆₂ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₈ S ₁	15,6	1389,7	1390,1
e	Ac-LKKPFNRPQGPen QPKTGPFFEDLK-NH ₂ (166)	2598,03	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₃₁ S ₁	17,2	2597,4	2598,1
f	Ac-LKKPFNRPQG-SBn (164)	1332,61	C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₁	19,3	1332,7	1333,1
Kontrollexperiment – Reaktion von H-LYKAG-SR (140) und H-VRAEYS-NH ₂ (159) (Abb. 6.8)						
a	H-LYKAGVRAEYS-NH ₂ (160)	1255,42	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆	19,3	1255,7	1255,6
b	H-LYKAG-NH ₂ (157)	549,33	C ₂₆ H ₄₃ N ₇ O ₆	11,8	550,3	550,4
c	H-VRAEYS-NH ₂ (159)	722,79	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀	12,3	723,3	722,8
d	H-LYKAG-OH (158)	550,65	C ₂₆ H ₄₂ N ₆ O ₇	12,8	551,3	551,3

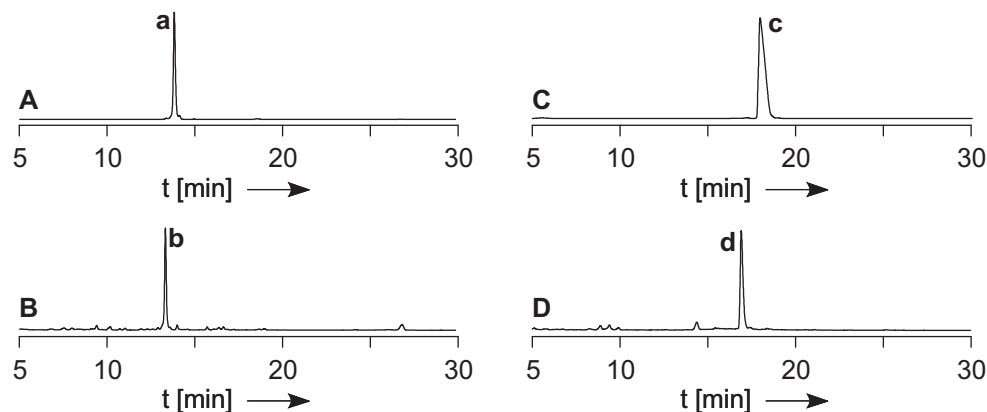


Abbildung 6.10: Metall-freie Entschwefelung von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ (**A**, **B**) und H-LYKAHPenRAEYS-NH₂ (**C**, **D**). **A**: Chromatogramm von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ (**154**); **B**: Entschwefelung von **154** nach 2,5 Stunden; **C**: Chromatogramm von H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ (**172**); **D**: Entschwefelung von **172** nach 2,5 Stunden. (HPLC-Bedingungen: Gradient 2; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.9.

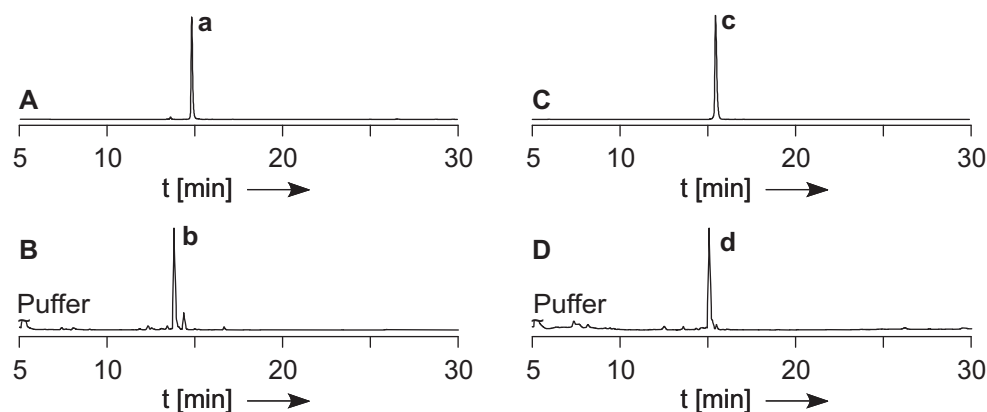


Abbildung 6.11: Metall-freie Entschwefelung von H-LYKAMPenRAEYS-NH₂ (**A**, **B**) und H-LYKALPenRAEYS-NH₂ (**C**, **D**). Die Entschwefelung des methionin-haltigen Peptides **176** wurde bei 37 °C über 6 Stunden durchgeführt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit oder Erhöhung der Temperatur resultierte in der Bildung von Peptiden mit oxidiertem Methioninrest. **A**: Chromatogramm von H-LYKAMPenRAEYS-NH₂ (**176**); **B**: Entschwefelung von **176** nach 6 Stunden; **C**: Chromatogramm von H-LYKALPenRAEYS-NH₂ (**179**); **D**: Entschwefelung von **179** nach 2,5 Stunden. (HPLC-Bedingungen: Gradient 3; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.9.

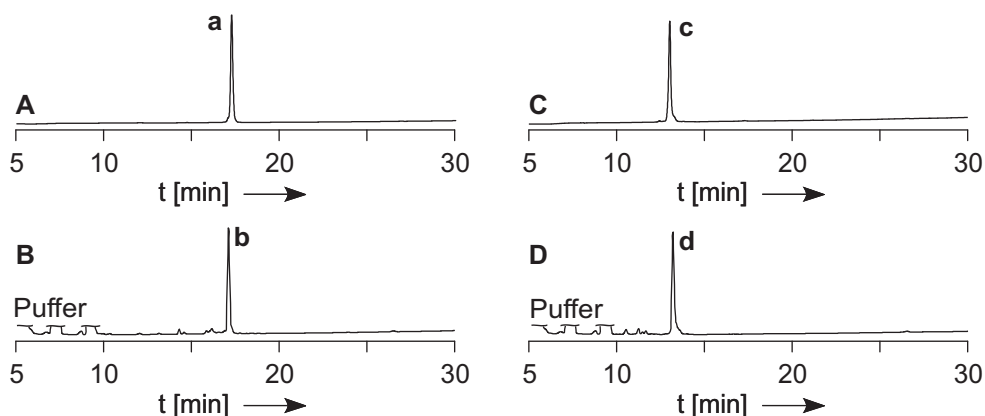


Abbildung 6.12: Metall-freie Entschwefelung des STAT-1 Segmentes 176–197 (**A**, **B**) und des Syk-Kinase-Segmentes 103 – 124 (**C**, **D**). **A**: Chromatogramm von Ac-TLQNREHETNGPenAKSDQKQEQQL-NH₂ (**165**); **B**: Entschwefelung von **165** nach 2,5 Stunden; **C**: Chromatogramm von Ac-LKKPFNRPQGPenQPKTGPFEDLK-NH₂ (**166**); **D**: Entschwefelung von **166** nach 2,5 Stunden. (HPLC-Bedingungen: Gradient 3; $\lambda = 222$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.9.

Tabelle 6.9: Zuordnung der Reaktionskomponenten metall-basierten und metall-freie Entschwefelung

Bez. Sequenz	MW [g · mol ⁻¹]	Summenformel	HPLC t _R [min]	MS: ber. [M+H] ⁺	gef.
Metall-basierte Entschwefelung von H-LYKAGPenRAEYS-NH ₂ (154) (Abb. 6.9 A/B)					
a H-LYKAGPenRAEYS-NH ₂ (154)	1287,49	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	21,5	1287,7	1288,0 ^[a]
b H-LYKAGVRAEYS-NH ₂ (160)	1255,42	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆	19,3	1255,7	1255,4 ^[a]
Metall-basierte Entschwefelung des Syk-Kinase Segmentes 103 – 124 (Abb. 6.9 C/D)					
c Ac-LKKPFNRPQGPenQPKTGPFEDLK-NH ₂ (166)	2598,03	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₃₁ S ₁	17,2	2597,4	2598,1 ^[a]
d Ac-LKKPFNRPQGVQPKTGPFEDLK-NH ₂ (189)	2565,97	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₃₁	16,9	2565,4	2565,7 ^[a]
Metall-freie Entschwefelung von H-LYKAGPenRAEYS-NH ₂ (154) (Abb. 6.10 A/B)					
a H-LYKAGPenRAEYS-NH ₂ (154)	1287,49	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	14,1	1287,7	1288,0 ^[a]
b H-LYKAGVRAEYS-NH ₂ (160)	1255,42	C ₅₇ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₆	13,0	1255,7	1256,2 ^[a]
Metall-freie Entschwefelung von H-LYKAHPenRAEYS-NH ₂ (172) (Abb. 6.10 C/D)					
c H-LYKAHPenRAEYS-NH ₂ (172)	1367,57	C ₆₁ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₆ S ₁	17,5	1367,7	1368,2 ^[a]
d H-LYKAHVRAEYS-NH ₂ (185)	1335,51	C ₆₁ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₆	16,9	1335,7	1335,7 ^[b]
Metall-freie Entschwefelung von H-LYKAMPenRAEYS-NH ₂ (176) (Abb. 6.11 A/B)					
a H-LYKAMPenRAEYS-NH ₂ (176)	1361,63	C ₆₀ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₂	14,9	1361,7	1361,8 ^[a]
b H-LYKAMVRAEYS-NH ₂ (186)	1329,57	C ₆₀ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	14,0	1329,7	1329,8 ^[b]
Metall-freie Entschwefelung von H-LYKALPenRAEYS-NH ₂ (179) (Abb. 6.11 C/D)					
c H-LYKALPenRAEYS-NH ₂ (179)	1343,59	C ₆₁ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	15,3	1343,7	1343,3 ^[a]
d H-LYKALVRAEYS-NH ₂ (187)	1311,53	C ₆₁ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₆	14,9	1311,7	1311,9 ^[b]
Metall-freie Entschwefelung des STAT-1 Segmentes 176–197 (165) (Abb. 6.12 A/B)					
a Ac-TLQÑREHETNGPenAKSDQKQEQQL-NH ₂ (165)	2626,81	C ₁₀₆ H ₁₇₆ N ₃₆ O ₄₀ S ₁	13,0	2626,3	2627,1 ^[a]
b Ac-TLQÑREHETNGVAKSDQKQEQQL-NH ₂ (188)	2594,75	C ₁₀₆ H ₁₇₆ N ₃₆ O ₄₀	12,8	2594,3	2594,9 ^[a]
Metall-freie Entschwefelung des Syk-Kinase Segmentes 103–124 (166) (Abb. 6.12 C/D)					
c Ac-LKKPFNRPQGPenQPKTGPFEDLK-NH ₂ (166)	2598,03	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₃₁ S ₁	17,2	2597,4	2598,1 ^[a]
d Ac-LKKPFNRPQGVQPKTGPFEDLK-NH ₂ (189)	2565,97	C ₁₁₈ H ₁₈₉ N ₃₃ O ₃₁	16,9	2565,4	2565,7 ^[a]

^[a]MALDI-TOF-MS ^[b]ESI-MS

6.6 Versuche zu Kapitel 4.3: Ligation mit internem Cystein

6.6.1 Synthese der Peptide

Die Peptide wurden im 5 μmol -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidfestphasensynthese nach der Fmoc/tBu-Strategie (Abschnitt 6.2.3) an einem NovaSyn TGR-Harz (Beladungsgrad 200 $\mu\text{mol/g}$) synthetisiert. Für die Bestimmung der Syntheseausbeuten wurde die Ausbeute des Cysteinylopeptids **195** als Bezugswert genutzt. Dessen Syntheseausbeute wurde anhand der in Abschnitt 6.1.11 beschriebenen Vorgehensweise ermittelt [$\text{OD}_{280} = 0,346$ ($\varepsilon_{280} = 1280 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)]. Der hierbei bestimmte Wert wurde mit der Absorption der HPLC-Spur ins Verhältnis gesetzt und basierend darauf die Konzentration der anderen Peptide bestimmt. Die Ausbeutebestimmung setzte voraus, dass alle HPLC-Untersuchungen quantitativ erfolgten und keinerlei Peptidmaterial durch Adsorption der HPLC-Säule verloren ging. Die analytischen Daten befinden sich in Tabelle 6.10 und 6.11.

6.6.2 Ligationen

Die Durchführung der Ligationen erfolgte unter Verwendung der Allgemeinen Vorschrift für die Ligation von Peptiden mit sequenz-internem Cystein (Abschnitt 6.2.5). Die Unterscheidung von Ligationsprodukten und Thioesterzwischenstufen erfolgte durch eine HPLC-Untersuchung nach einer 5minütigen Behandlung mit Natronlauge (2 M). Die Chromatogramme befinden sich in Abbildung 6.13 bis 6.42.

Table 6.10: Analytische Daten der Peptide **195** - **209**.

Bez.	Sequenz	Ausbeute	HPLC-	MW	Summenformel	HPLC		MALDI-TOF-MS	
		[$\mu\text{mol}/\text{mg}/\%$]	Abs. [mAu]			t_R [min]	ber. [M+H] ⁺	gef.	
195	H-GCREAYS-NH ₂	2,7/2,1/53	4394886	783,85	C ₃₁ H ₄₉ N ₁₁ O ₁₁ S ₁	9,5	784,3	784,2	
196	H-GGCRAEYS-NH ₂	2,5/2,1/50	4145952	840,36	C ₃₃ H ₅₂ N ₁₂ O ₁₂ S ₁	9,6	841,4	840,9	
197	H-GGGCRAEYS-NH ₂	2,8/2,5/55	4560555	897,96	C ₃₅ H ₅₅ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	9,6	897,7	898,4	
198	H-GGGGCRAEYS-NH ₂	3,3/3,1/65	5390002	955,01	C ₃₇ H ₅₈ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	9,6	955,4	955,8	
199	H-GGGGCRAEYS-NH ₂	3,8/3,8/75	6218977	1012,06	C ₃₉ H ₆₁ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	9,7	1012,4	1012,0	
200	H-GGGARA EYS-NH ₂	4,0/3,5/80	6631521	865,89	C ₃₅ H ₅₅ N ₁₃ O ₁₃	8,2	866,4	866,3	
201	H-ACRAEYS-NH ₂	3,3/2,6/65	5369974	797,88	C ₃₂ H ₅₁ N ₁₁ O ₁₁ S ₁	10,0	798,4	798,5	
202	H-AGCRAEYS-NH ₂	2,9/2,5/58	4798863	854,93	C ₃₄ H ₅₄ N ₁₂ O ₁₂ S ₁	9,9	855,4	855,3	
203	H-AGGCRAEYS-NH ₂	2,9/2,5/58	5228061	911,98	C ₃₆ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	9,9	912,4	912,4	
204	H-AGGGCRAEYS-NH ₂	3,1/3,0/62	5139874	969,03	C ₃₈ H ₆₀ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	10,0	969,4	969,7	
205	H-AGGGGCRAEYS-NH ₂	3,6/3,6/71	5859783	1026,08	C ₄₀ H ₆₃ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	10,5	1026,4	1026,8	
206	H-AGGGGCRAEYS-NH ₂	3,4/3,7/68	5599871	1083,14	C ₄₂ H ₆₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	10,1	1083,5	1083,9	
207	H-AGGARA EYS-NH ₂	4,0/3,5/79	6582632	879,92	C ₃₆ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₃	9,0	880,4	880,8	
208	H-AGDCRAEYS-NH ₂	3,2/3,1/63	5203465	970,02	C ₃₈ H ₅₉ N ₁₃ O ₁₅ S ₁	10,6	970,4	970,4	
209	H-AGGDCRAEYS-NH ₂	3,2/3,3/64	5289465	1027,07	C ₄₀ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₆ S ₁	10,7	1027,4	1027,5	

Table 6.11: Analytische Daten der Peptide **210** - **223**.

Bez.	Sequenz	Ausbeute		HPLC-		MW	Summenformel	HPLC		MALDI-TOF-MS	
		[$\mu\text{mol}/\text{mg}/\%$]		Abs.	[mAu]			t_R	[min]	ber.	gef.
										[M+H] ⁺	
210	H-AGGGDCRAEYS-NH ₂	3,1/3,4/62	5140012	1084,12	C ₄₂ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₇ S ₁	10,4	1084,5	1084,4			
211	H-AGGGGDCRAEYS-NH ₂	2,9/3,3/58	4798465	1141,17	C ₄₄ H ₆₈ N ₁₆ O ₁₈ S ₁	10,3	1141,5	1141,4			
212	H-AGNCRAEYS-NH ₂	2,8/2,7/55	4560598	969,03	C ₃₈ H ₆₀ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	10,4	969,4	969,7			
213	H-AGGNCRAEYS-NH ₂	2,7/2,8/54	4478002	1026,08	C ₄₀ H ₆₃ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	9,9	1026,4	1026,7			
214	H-AGGGNCRAEYS-NH ₂	2,8/3,0/56	4394701	1083,14	C ₄₂ H ₆₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	10,3	1083,5	1083,8			
215	H-AGGGGNCRAEYS-NH ₂	2,7/3,0/53	4395121	1140,19	C ₄₄ H ₆₉ N ₁₇ O ₁₇ S ₁	10,0	1140,5	1141,0			
216	H-PCRAEYS-NH ₂	2,8/2,3/56	4646488	823,92	C ₃₄ H ₅₃ N ₁₁ O ₁₁ S ₁	10,6	824,4	824,2			
217	H-APCRAEYS-NH ₂	2,7/2,4/54	4477598	894,99	C ₃₇ H ₅₈ N ₁₂ O ₁₂ S ₁	11,4	895,4	895,4			
218	H-AGPCRAEYS-NH ₂	2,9/2,7/57	4726412	952,04	C ₃₉ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	11,9	952,4	952,7			
219	H-AGGPCRAEYS-NH ₂	2,7/2,7/53	4394215	1009,10	C ₄₁ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	11,5	1009,5	1010,0			
220	H-AGGGPCRAEYS-NH ₂	2,8/3,0/56	4643345	1066,15	C ₄₃ H ₆₇ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	11,6	1066,5	1066,5			
221	H-AGGGGPCRAEYS-NH ₂	2,8/3,1/55	4560412	1123,20	C ₄₅ H ₇₀ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	11,6	1123,5	1123,5			
222	H-DYYDCRVEHWG-NH ₂	2,7/3,9/54	79854899	1441,53	C ₆₄ H ₈₄ N ₁₈ O ₁₉ S ₁	12,8	1441,6	1442,2			
223	H-KHSDCLLFYNKS-NH ₂	3,0/4,4/60	4963512	1453,66	C ₆₅ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₈ S ₁	13,5	1453,7	1454,3			

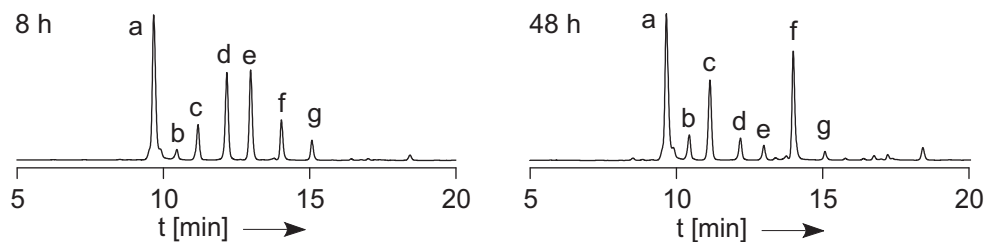


Abbildung 6.13: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-GCRAEYS-NH₂ **195**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.12.

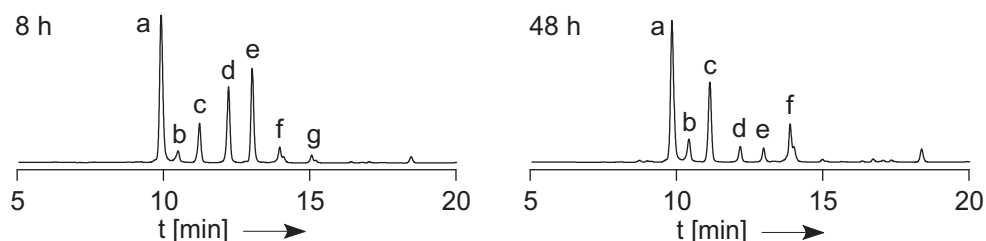


Abbildung 6.14: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-GGCRAEYS-NH₂ **196**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.12.

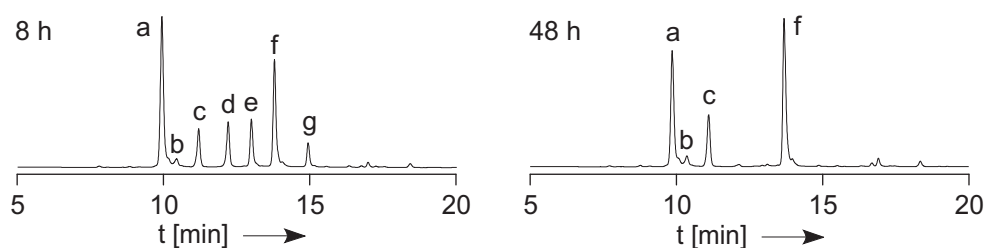


Abbildung 6.15: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-GGGCRAEYS-NH₂ **197**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.12.

Tabelle 6.12: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen mit H-G₁₋₃CRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-GCRAEYS-NH ₂ 195 (Abb. 6.13)							
a	H-GCRAEYS-NH ₂	783,85	C ₃₁ H ₄₉ N ₁₁ O ₁₁ S ₁	9,5	784,3		784,4
b	H-LYRAG-NH ₂	577,67	C ₂₆ H ₄₃ N ₉ O ₆	10,1	578,3		578,4
c	H-LYRAG-OH	578,66	C ₂₆ H ₄₂ N ₆ O ₇	10,9	579,3		579,4
d	H-LYRAG-SPAAG	722,86	C ₃₁ H ₅₀ N ₁₀ O ₈ S ₁	12,0	723,4		723,4
e	H-GC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1344,5	C ₅₇ H ₈₉ N ₁₉ O ₁₇ S ₁	13,0		672,7	672,8
f	H-LYRAGGGCRAEYS-NH ₂	1344,5	C ₅₇ H ₈₉ N ₁₉ O ₁₇ S ₁	14,2	1344,6		1344,6
g	H-LYRAGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1905,14	C ₈₃ H ₁₂₉ N ₂₇ O ₂₃ S ₁	15,3	953,0		953,2
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-GGCRAEYS-NH ₂ 196 (Abb. 6.14)							
a	H-GGCRAEYS-NH ₂	840,36	C ₃₃ H ₅₂ N ₁₂ O ₁₂ S ₁	10,0	841,4		841,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
e	H-GGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1401,55	C ₅₉ H ₉₂ N ₂₀ O ₁₈ S ₁	13,1		701,3	701,6
f	H-LYRAGGGCRAEYS-NH ₂	1401,55	C ₅₉ H ₉₂ N ₂₀ O ₁₈ S ₁	14,1	1401,7		1401,6
g	H-LYRAGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1962,20	C ₈₅ H ₁₃₂ N ₂₈ O ₂₄ S ₁	15,1	981,5		981,6
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-GGCRAEYS-NH ₂ 197 (Abb. 6.15)							
a	H-GGCRAEYS-NH ₂	897,96	C ₃₅ H ₅₅ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	10,0	898,4		898,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
e	H-GGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1457,68	C ₆₁ H ₉₅ N ₂₁ O ₁₉ S ₁	13,1	730,0		730,0
f	H-LYRAGGGCRAEYS-NH ₂	1457,68	C ₆₁ H ₉₅ N ₂₁ O ₁₉ S ₁	14,1	1458,7		1458,8
g	H-LYRAGGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	2019,25	C ₈₇ H ₁₃₅ N ₂₉ O ₂₅ S ₁	15,1	1010,0		1010,6

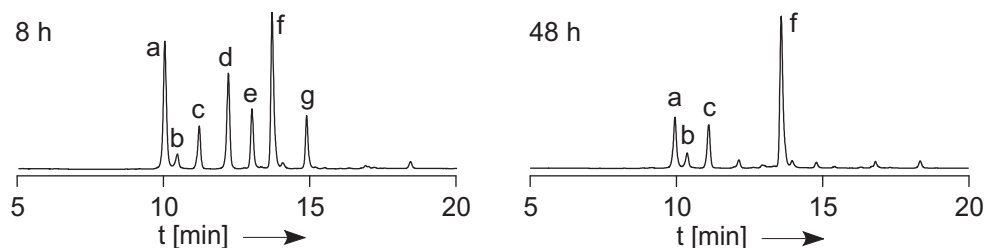


Abbildung 6.16: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-GGGGCRAEYS-NH₂ **198**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.13.

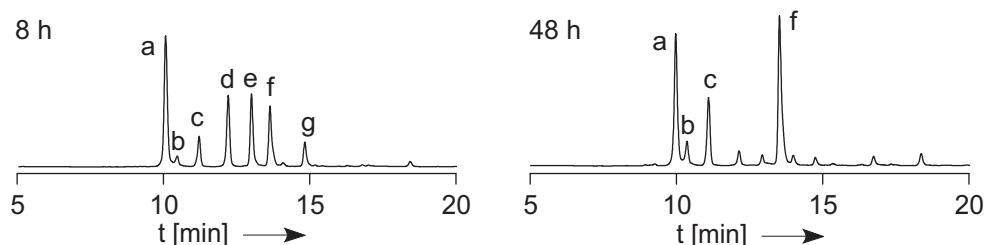


Abbildung 6.17: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-GGGGGCRAEYS-NH₂ **198**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.13.

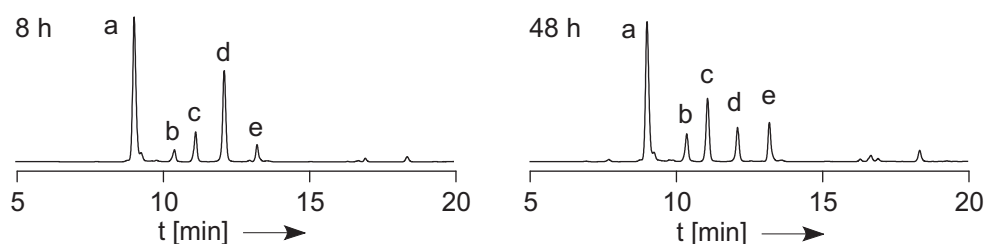


Abbildung 6.18: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-GGGARAEYS-NH₂ **200**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.13

Tabelle 6.13: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen mit H-G₄₋₅CRAEYS-NH₂ und H-GGGARAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	gefunden [M+H] ⁺	gefunden [M+2H] ²⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-GGGGCRAEYS-NH ₂ 198 (Abb. 6.16)							
a	H-GGGGCRAEYS-NH ₂	783,85	C ₃₇ H ₅₈ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	9,5	784,3	784,4	
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	
e	H-GGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1515,65	C ₆₃ H ₉₈ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	13,1	1515,7	1515,6	
f	H-LYRAGGGGGCRAEYS-NH ₂	1515,56	C ₆₃ H ₉₈ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	14,1	1515,7	1515,6	
g	H-LYRAGGGGGC (LYRAG)RAEYS-NH ₂	2076,30	C ₈₉ H ₁₃₈ N ₃₀ O ₂₆ S ₁	15,1	1038,5		1039,2
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-GGGGGCRAEYS-NH ₂ 199 (Abb. 6.17)							
a	H-GGGGGCRAEYS-NH ₂	1012,06	C ₃₉ H ₆₁ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	9,7	1012,4	1012,4	
b	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	
e	H-GGGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1572,70	C ₆₅ H ₁₀₁ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	13,1	786,9		787,0
f	H-LYRAGGGGGCRAEYS-NH ₂	1572,70	C ₆₅ H ₁₀₁ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	13,7	1572,7	1572,8	
g	H-LYRAGGGGGC (LYRAG)RAEYS-NH ₂	2133,35	C ₉₁ H ₁₄₁ N ₃₁ O ₂₇ S ₁	15,1	1067,0		1067,2
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-GGGACRAEYS-NH ₂ 200 (Abb. 6.18)							
a	H-GGGARAEYS-NH ₂	865,89	C ₃₅ H ₅₅ N ₁₃ O ₁₃	9,2	866,4	866,4	
b	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	
e	H-LYRAGGGGARAEYS-NH ₂	1426,54	C ₆₁ H ₉₅ N ₂₁ O ₁₉	13,4	1426,7		1426,6

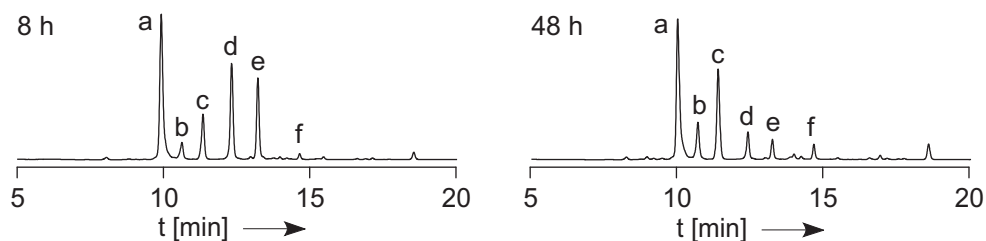


Abbildung 6.19: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-ACRAEYS-NH₂ **201**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.14.

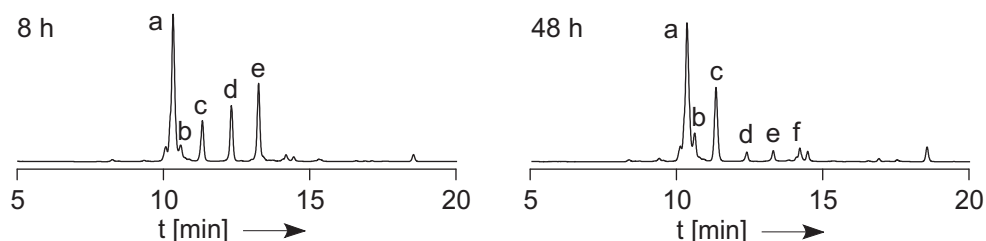


Abbildung 6.20: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGCRAEYS-NH₂ **202**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.14.

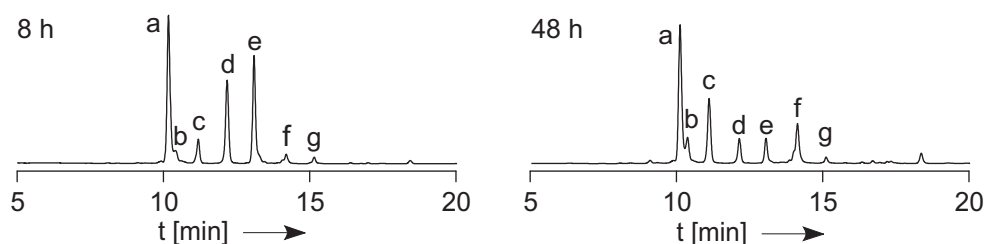


Abbildung 6.21: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGCRAEYS-NH₂ **203**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.14.

Tabelle 6.14: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen mit H-AG₀₋₂CRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺ [M+2H] ²⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-ACRAEYS-NH ₂ 201 (Abb. 6.19)							
a	H-ACRAEYS-NH ₂	797,88	C ₃₂ H ₅₁ N ₁₁ O ₁₁ S ₁	10,0	798,4		798,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1358,52	C ₅₈ H ₉₁ N ₁₉ O ₁₇ S ₁	13,3		679,8	680,0
f	H-LYRAGACRAEYS-NH ₂	1358,52	C ₅₈ H ₉₁ N ₁₉ O ₁₇ S ₁	14,6		679,8	680,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGCRAEYS-NH ₂ 202 (Abb. 6.20)							
a	H-AGCRAEYS-NH ₂	854,93	C ₃₄ H ₅₄ N ₁₂ O ₁₂ S ₁	9,9	855,4		855,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1415,58	C ₆₀ H ₉₄ N ₂₀ O ₁₈ S ₁	13,3		708,3	708,4
f	H-LYRAGAGCRAEYS-NH ₂	1415,58	C ₆₀ H ₉₄ N ₂₀ O ₁₈ S ₁	14,6		708,3	708,6
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGCRAEYS-NH ₂ 203 (Abb. 6.21)							
a	H-AGGCRAEYS-NH ₂	911,98	C ₃₆ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	9,9	912,4		912,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1472,63	C ₆₂ H ₉₇ N ₂₁ O ₁₉ S ₁	13,1	1472,7		1473,4
f	H-LYRAGAGCRAEYS-NH ₂	1472,63	C ₆₂ H ₉₇ N ₂₁ O ₁₉ S ₁	14,2	1472,7		1472,8
g	H-LYRAGAGGC (LYRAG)RAEYS-NH ₂	2033,27	C ₈₈ H ₁₃₇ N ₂₉ O ₂₅ S ₁	15,1		1017,0	1017,4

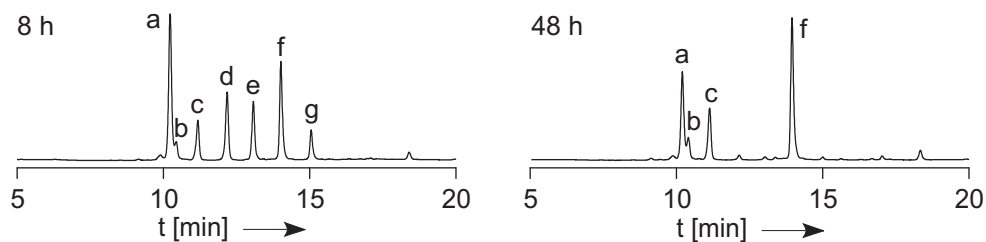


Abbildung 6.22: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGCRAEYS-NH₂ **204**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.15.

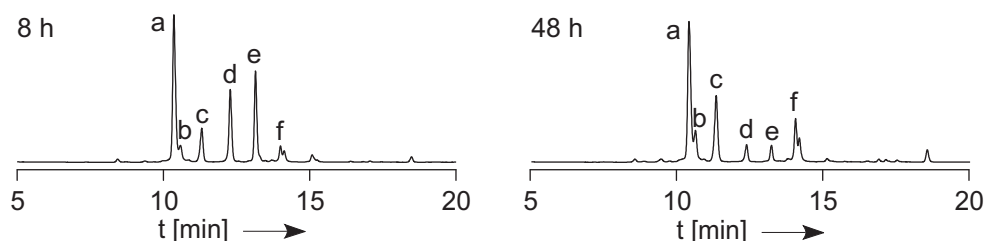


Abbildung 6.23: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGGCRAEYS-NH₂ **205**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.15.

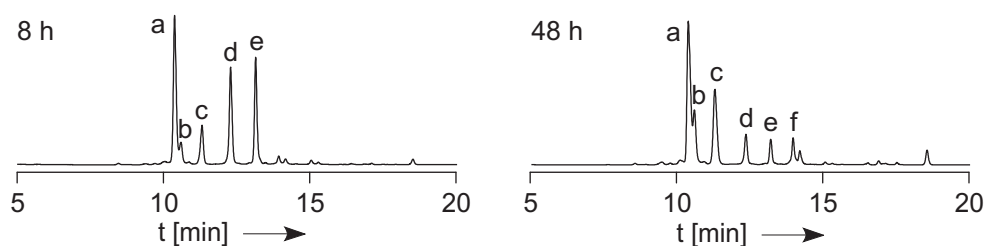


Abbildung 6.24: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGGGCRAEYS-NH₂ **206**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.15.

Tabelle 6.15: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen mit H-AG₃₋₅GGCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+2H] ²⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGCRAEYS-NH ₂ 204 (Abb. 6.22)							
a	H-AGGGCRAEYS-NH ₂	969,03	C ₃₈ H ₆₀ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	10,2	969,4		969,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1529,68	C ₆₄ H ₁₀₀ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	13,1		765,4	
f	H-LYRAGAGGGCRAEYS-NH ₂	1529,68	C ₆₄ H ₁₀₀ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	14,2	1529,8		1529,8
g	H-LYRAGAGGGC (LYRAG)RAEYS-NH ₂	2100,32	C ₉₀ H ₁₄₀ N ₃₀ O ₂₆ S ₁	15,1	1045,5		1045,6
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGGCRAEYS-NH ₂ 205 (Abb. 6.23)							
a	H-AGGGGCRAEYS-NH ₂	1026,08	C ₄₀ H ₆₃ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	10,2	1026,4		1026,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1586,73	C ₆₆ H ₁₀₃ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	13,1		793,9	
f	H-LYRAGAGGGCRAEYS-NH ₂	1586,73	C ₆₆ H ₁₀₃ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	14,2	1586,7		1586,6
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGGCRAEYS-NH ₂ 206 (Abb. 6.24)							
a	H-AGGGGCRAEYS-NH ₂	1083,14	C ₄₂ H ₆₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	10,2	1083,5		1083,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGGGC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1643,78	C ₆₈ H ₁₀₆ N ₂₄ O ₂₂ S ₁	13,1		822,4	
f	H-LYRAGAGGGGCRAEYS-NH ₂	1643,78	C ₆₈ H ₁₀₆ N ₂₄ O ₂₂ S ₁	14,2		822,4	

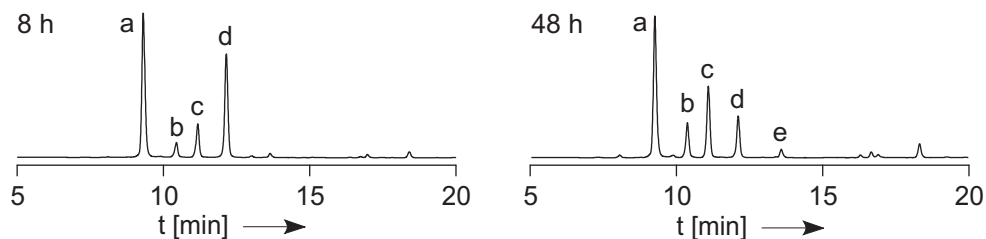


Abbildung 6.25: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGARAEYS-NH₂ **207**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.16.

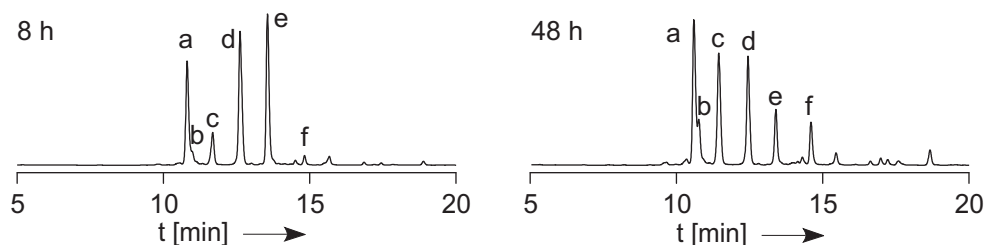


Abbildung 6.26: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGDCRAEYS-NH₂ **208**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.16.

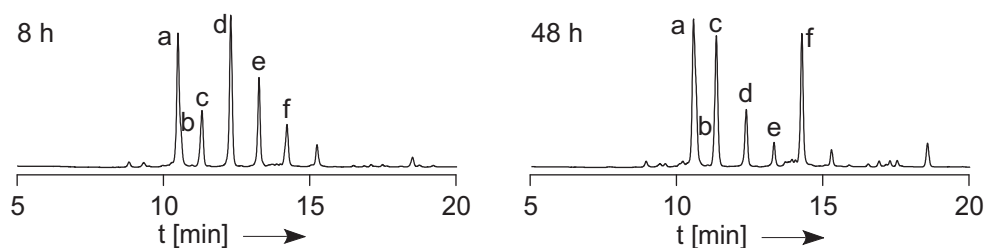


Abbildung 6.27: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGDCRAEYS-NH₂ **209**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.16.

Tabelle 6.16: Zuordnung der Reaktionskomp. der Ligationen mit H-AGGARAEYS-NH₂ und H-AG₁₋₂DCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺ [M+2H] ²⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGARAEYS-NH ₂ 207 (Abb. 6.25)							
a	H-AGGARAEYS-NH ₂	879,92	C ₃₆ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₃	9,5	880,4		880,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-LYRAGAGGARAEYS-NH ₂	1440,56	C ₆₂ H ₉₇ N ₂₁ O ₁₉	13,7	720,9		721,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGDCRAEYS-NH ₂ 208 (Abb. 6.26)							
a	H-AGDCRAEYS-NH ₂	970,02	C ₃₈ H ₅₉ N ₁₃ O ₁₅ S ₁	10,6	970,4		970,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
e	H-AGDC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1530,66	C ₆₄ H ₉₉ N ₂₁ O ₂₁ S ₁	13,5	765,7		766,0
f	H-LYRAGAGDCRAEYS-NH ₂	1530,66	C ₆₄ H ₉₉ N ₂₁ O ₂₁ S ₁	14,8	765,7		766,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGDCRAEYS-NH ₂ 209 (Abb. 6.27)							
a	H-AGGDCRAEYS-NH ₂	1027,07	C ₄₀ H ₆₂ N ₁₄ O ₁₆ S ₁	10,6	1027,4		1027,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
e	H-AGGDC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1587,72	C ₆₆ H ₁₀₂ N ₂₂ O ₂₂ S ₁	13,3	794,4		794,4
f	H-LYRAGAGGDCRAEYS-NH ₂	1587,72	C ₆₆ H ₁₀₂ N ₂₂ O ₂₂ S ₁	14,2	794,4		794,4

6.6 Versuche zu Kapitel 4.3: Ligation mit internem Cystein

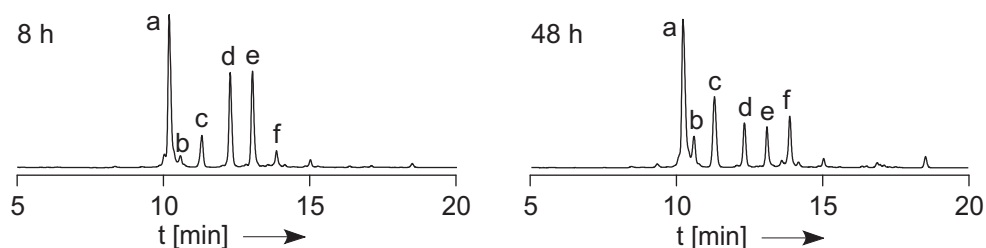


Abbildung 6.28: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGDCRAEYS-NH₂ **210**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.17.

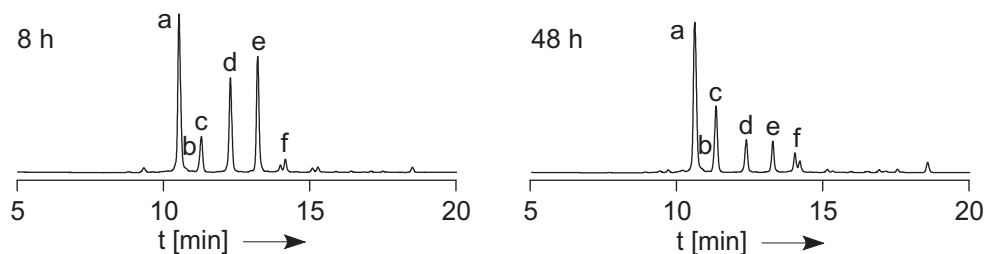


Abbildung 6.29: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGDCRAEYS-NH₂ **211**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.17.

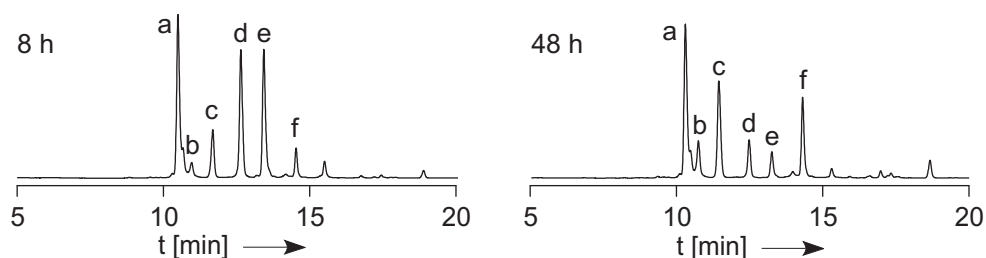


Abbildung 6.30: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGNCRAEYS-NH₂ **212**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.17.

Tabelle 6.17: Zuordnung der Reaktionskomp. der Ligationen mit H-AG₃₋₄GGDCRAEYS-NH₂ und H-AG₁NCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGDCRAEYS-NH ₂ 210 (Abb. 6.28)							
a	H-AGGGDCRAEYS-NH ₂	1084,12	C ₄₂ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₇ S ₁	10,2	1084,4		1084,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGDC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1644,77	C ₆₈ H ₁₀₅ N ₂₃ O ₂₃ S ₁	13,1	822,4		822,4
f	H-LYRAGAGGGDCRAEYS-NH ₂	1644,77	C ₆₈ H ₁₀₅ N ₂₃ O ₂₃ S ₁	14,2	822,4		822,4
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGDCRAEYS-NH ₂ 211 (Abb. 6.29)							
a	H-AGGGDCRAEYS-NH ₂	1141,17	C ₄₄ H ₆₈ N ₁₆ O ₁₈ S ₁	10,6	1141,5		1141,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGDC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1701,82	C ₇₀ H ₁₀₆ N ₂₄ O ₂₄ S ₁	13,3	851,4		851,6
f	H-LYRAGAGGGDCRAEYS-NH ₂	1701,82	C ₇₀ H ₁₀₆ N ₂₄ O ₂₄ S ₁	14,2	851,4		851,6
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGNCRAEYS-NH ₂ 212 (Abb. 6.30)							
a	H-AGNCRAEYS-NH ₂	969,03	C ₃₈ H ₆₀ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	10,4	969,4		969,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGNC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1529,68	C ₆₄ H ₁₀₀ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	13,4	765,4		765,6
f	H-LYRAGAGNCRAEYS-NH ₂	1529,68	C ₆₄ H ₁₀₀ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	14,5	765,4		765,6

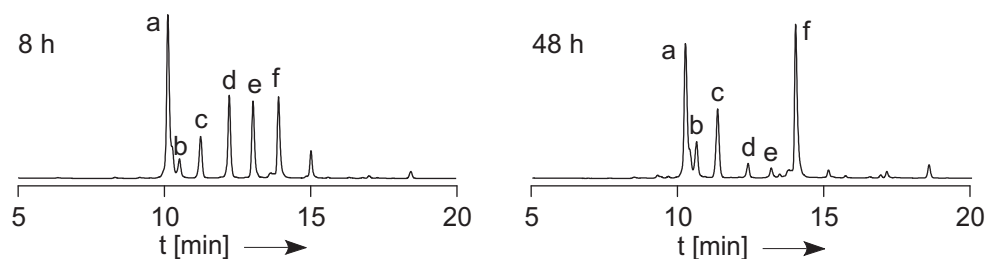


Abbildung 6.31: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGNCRAEYS-NH₂ **213**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.18.

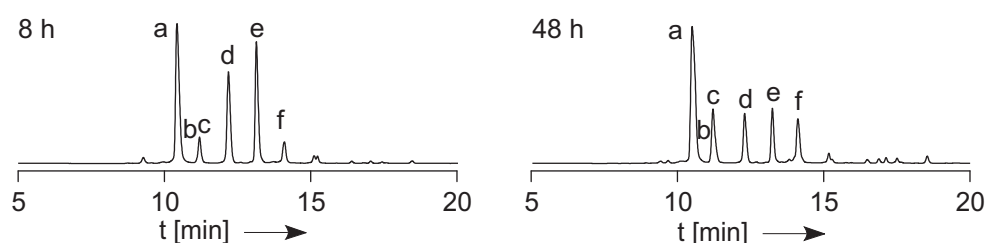


Abbildung 6.32: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGNCRAEYS-NH₂ **214**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.18.

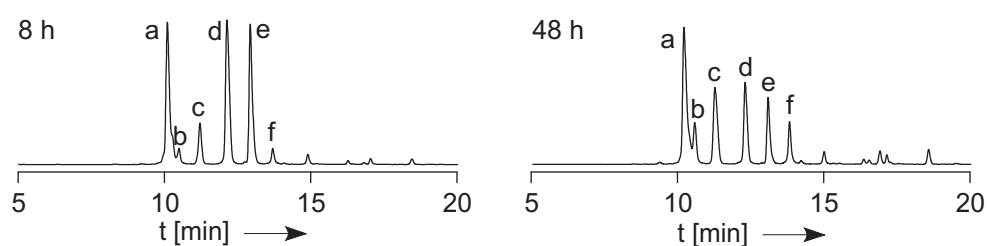


Abbildung 6.33: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGGNCRAEYS-NH₂ **215**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.18.

Tabelle 6.18: Zuordnung der Reaktionskomp. der Ligationen mit H-AG₂₋₄GNCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGNCRAEYS-NH ₂ 213 (Abb. 6.31)							
a	H-AGGNCRAEYS-NH ₂	1026,08	C ₄₀ H ₆₃ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	10,3	1026,4		1026,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGNC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1586,73	C ₆₆ H ₁₀₃ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	13,2	793,9		794,0
f	H-LYRAGAGGNCRAEYS-NH ₂	1586,73	C ₆₆ H ₁₀₃ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	14,1	793,9		794,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGNCRAEYS-NH ₂ 214 (Abb. 6.32)							
a	H-AGGGNCRAEYS-NH ₂	1083,14	C ₄₂ H ₆₆ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	10,5	1083,5		1083,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGNC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1643,78	C ₆₈ H ₁₀₆ N ₂₄ O ₂₂ S ₁	13,2	822,4		823,0
f	H-LYRAGAGGNCRAEYS-NH ₂	1643,78	C ₆₈ H ₁₀₆ N ₂₄ O ₂₂ S ₁	14,2	822,4		823,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGNCRAEYS-NH ₂ 215 (Abb. 6.33)							
a	H-AGGGNCRAEYS-NH ₂	1140,19	C ₄₄ H ₆₉ N ₁₇ O ₁₇ S ₁	10,2	1140,5		1140,6
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGNC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1700,83	C ₇₀ H ₁₀₉ N ₂₅ O ₂₃ S ₁	13,0	850,9		851,0
f	H-LYRAGAGGGNCRAEYS-NH ₂	1700,83	C ₇₀ H ₁₀₉ N ₂₅ O ₂₃ S ₁	13,8	850,9		851,0

6.6 Versuche zu Kapitel 4.3: Ligation mit internem Cystein

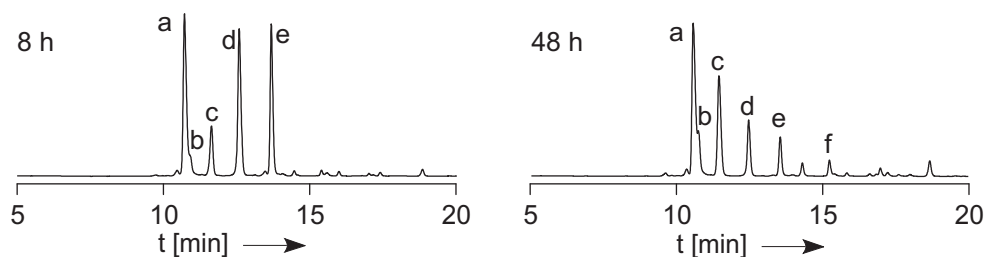


Abbildung 6.34: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-PCRAEYS-NH₂ **216**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.19.

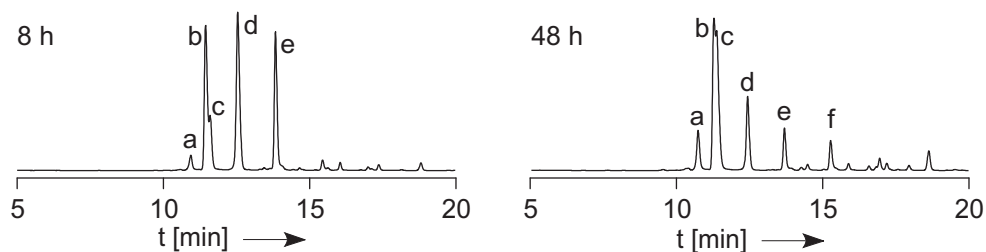


Abbildung 6.35: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-APCRAEYS-NH₂ **217**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.19.

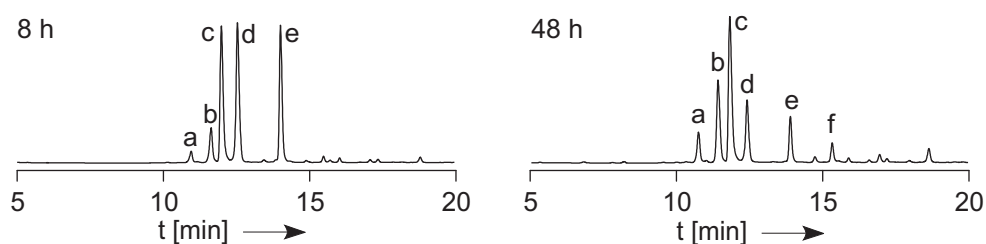


Abbildung 6.36: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGPCRAEYS-NH₂ **218**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.19.

Tabelle 6.19: Zuordnung der Reaktionskomp. der Ligationen mit H-PCRAEYS-NH₂ und H-AG₀₋₁PCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺ [M+2H] ²⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-PCRAEYS-NH ₂ 216 (Abb. 6.34)							
a	H-PCRAEYS-NH ₂	823,92	C ₃₄ H ₅₃ N ₁₁ O ₁₁ S ₁	10,8	824,4		824,4
b	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-PC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1384,56	C ₆₀ H ₉₃ N ₁₉ O ₁₇ S ₁	13,7	692,8	693,0	693,0
f	H-LYRAGAPCRAEYS-NH ₂	1384,56	C ₆₀ H ₉₃ N ₁₉ O ₁₇ S ₁	15,2	692,8	693,0	693,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-APCRAEYS-NH ₂ 217 (Abb. 6.35)							
a	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
b	H-APCRAEYS-NH ₂	894,99	C ₃₇ H ₅₈ N ₁₂ O ₁₂ S ₁	11,5	895,4		895,4
c	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
e	H-APC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1455,64	C ₆₃ H ₉₈ N ₂₀ O ₁₈ S ₁	13,9	728,4	728,6	728,6
f	H-LYRAGAPCRAEYS-NH ₂	1455,64	C ₆₃ H ₉₈ N ₂₀ O ₁₈ S ₁	15,3	728,4	728,6	728,6
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGPCRAEYS-NH ₂ 218 (Abb. 6.36)							
a	H-LYRAG-NH ₂	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
b	H-LYRAG-OH	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
c	H-AGPCRAEYS-NH ₂	952,04	C ₃₉ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	12,0	952,4		952,5
d	H-LYRAG-SPAAG	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		s.o.
e	H-AGPC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1512,69	C ₆₅ H ₁₀₁ N ₂₁ O ₁₉ S ₁	13,9	757,9	758,0	758,0
f	H-LYRAGAGPCRAEYS-NH ₂	1512,69	C ₆₅ H ₁₀₁ N ₂₁ O ₁₉ S ₁	15,3	757,9	758,0	758,0

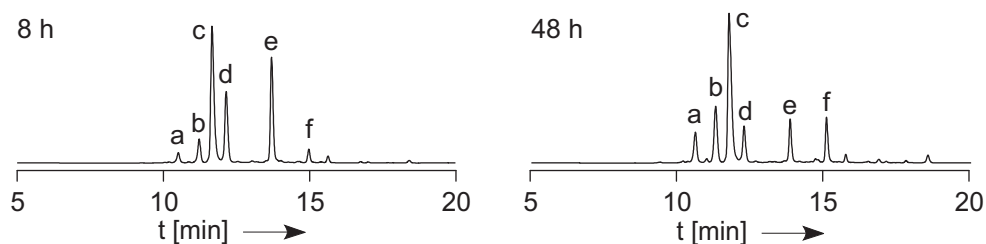


Abbildung 6.37: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGPCRAEYS-NH₂ **219**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.20.

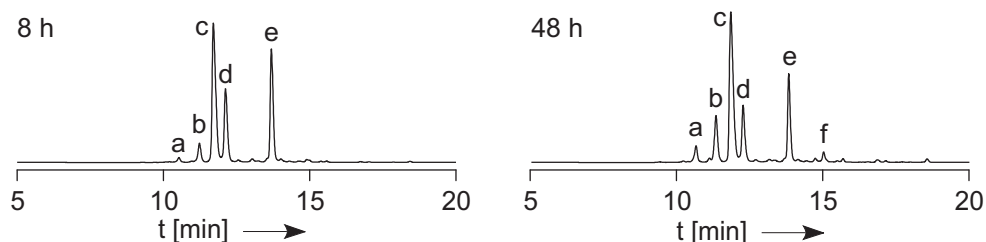


Abbildung 6.38: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGPCRAEYS-NH₂ **220**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.20.

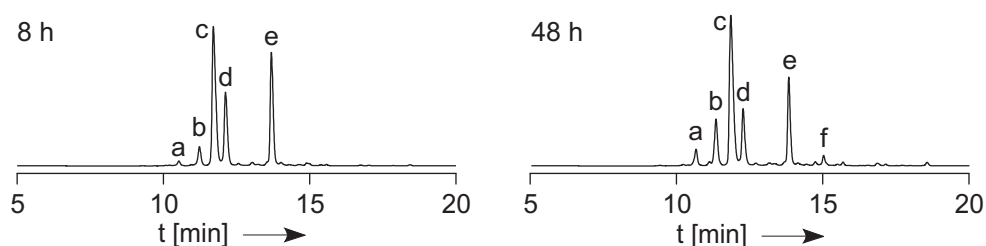


Abbildung 6.39: Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGGPCRAEYS-NH₂ **221**. HPLC-Analytik nach 8 und 48 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.20.

Tabelle 6.20: Zuordnung der Reaktionskomp. der Ligationen mit H-AG₂₋₄GPCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz	MW	Summenformel	HPLC		ESI-MS	
				t _R [min]	berechnet [M+H] ⁺	berechnet [M+2H] ²⁺	gefunden [M+H] ⁺ [M+2H] ²⁺
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGPCRAEYS-NH ₂ 219 (Abb. 6.37)							
a	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
b	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-AGGGPCRAEYS-NH ₂	1009,10	C ₄₁ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₄ S ₁	11,8	1009,5		1008,6
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGPC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1569,74	C ₆₇ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	13,8		785,4	785,4
f	H-LYRAGAGGGPCRAEYS-NH ₂	1569,74	C ₆₇ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₂₀ S ₁	15,1		785,4	785,4
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGPCRAEYS-NH ₂ 220 (Abb. 6.38)							
a	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
b	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-AGGGPCRAEYS-NH ₂	1066,15	C ₄₃ H ₆₇ N ₁₅ O ₁₅ S ₁	11,8	1066,5		1066,1
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGPC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1626,79	C ₆₉ H ₁₀₇ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	13,8		813,9	814,0
f	H-LYRAGAGGGPCRAEYS-NH ₂	1626,79	C ₆₉ H ₁₀₇ N ₂₃ O ₂₁ S ₁	15,1		813,9	814,0
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGGGPCRAEYS-NH ₂ 221 (Abb. 6.39)							
a	H-LYRAG-NH ₂	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
b	H-LYRAG-OH	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
c	H-AGGGGPCRAEYS-NH ₂	1123,20	C ₄₅ H ₇₀ N ₁₆ O ₁₆ S ₁	11,9	1123,5		1123,5
d	H-LYRAG-SPAAG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.
e	H-AGGGGPC(LYRAG)RAEYS-NH ₂	1683,85	C ₇₁ H ₁₁₀ N ₂₄ O ₂₂ S ₁	13,8		842,4	842,6
f	H-LYRAGAGGGGPCRAEYS-NH ₂	1683,85	C ₇₁ H ₁₁₀ N ₂₄ O ₂₂ S ₁	14,9		842,4	842,6

6.6 Versuche zu Kapitel 4.3: Ligation mit internem Cystein

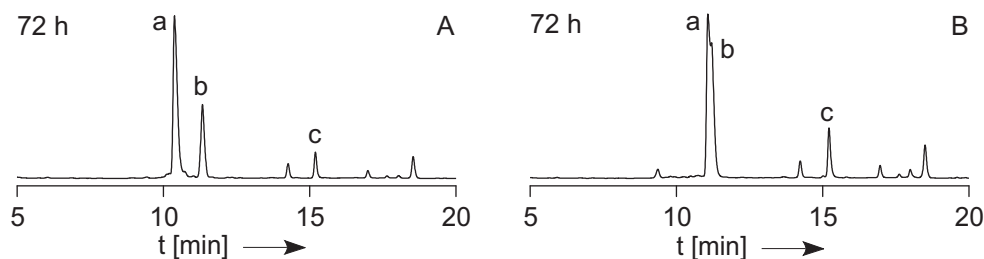


Abbildung 6.40: **A:** Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-PCRAEYS-NH₂ **216** (2 äq.). **B:** Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-APCRAEYS-NH₂ **217** (2 äq.). HPLC-Analytik nach 72 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.21.

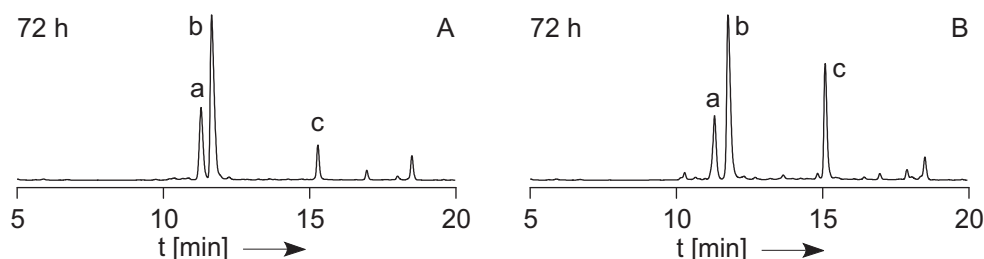


Abbildung 6.41: **A:** Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGPCRAEYS-NH₂ **218** (2 äq.). **B:** Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGPCRAEYS-NH₂ **219** (2 äq.). HPLC-Analytik nach 72 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.21 bzw. 6.21.

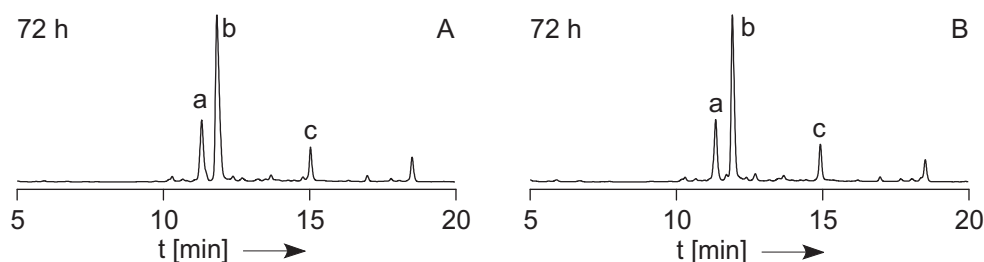


Abbildung 6.42: **A:** Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGPCRAEYS-NH₂ **220** (2 äq.). **B:** Reaktion von H-LYRAG-SPAAG **194** und H-AGGGGPCRAEYS-NH₂ **221** (2 äq.). HPLC-Analytik nach 72 Stunden (Gradient 4; $\lambda = 280$ nm). Die Zuordnung und Analytik der Reaktionskomponenten befindet sich in Tabelle 6.21.

Tabelle 6.21: Zuordnung der Reaktionskomponenten der Ligationen mit zwei Äquivalente H-PCRAEYS-NH₂, H-APCRAEYS-NH₂, H-AGPCRAEYS-NH₂

Bez.	Sequenz
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-PCRAEYS-NH ₂ 216 (2 äq.) (Abb. 6.40 A)	
a	H-PCRAEYS-NH ₂
b	H-LYRAG-OH
c	H-LYRAGPCRAEYS-NH ₂
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-APCRAEYS-NH ₂ 217 (2 äq.) (Abb. 6.40 B)	
a	H-APCRAEYS-NH ₂
b	H-LYRAG-OH
c	H-LYRAGAPCRAEYS-NH ₂
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGPCRAEYS-NH ₂ 218 (2 äq.) (Abb. 6.41 A)	
a	H-LYRAG-OH
b	H-AGPCRAEYS-NH ₂
c	H-LYRAGAGPCRAEYS-NH ₂
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGPCRAEYS-NH ₂ 219 (2 äq.) (Abb. 6.41 B)	
a	H-LYRAG-OH
b	H-AGGPCRAEYS-NH ₂
c	H-LYRAGAGGPCRAEYS-NH ₂
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGPCRAEYS-NH ₂ 220 (2 äq.) (Abb. 6.42 A)	
a	H-LYRAG-OH
b	H-AGGGPCRAEYS-NH ₂
c	H-LYRAGAGGGPCRAEYS-NH ₂
Ligation von H-LYRAG-SPAAG 194 und H-AGGPCRAEYS-NH ₂ 221 (2 äq.) (Abb. 6.42 B)	
a	H-LYRAG-OH
b	H-AGGGGPCRAEYS-NH ₂
c	H-LYRAGAGGGGPCRAEYS-NH ₂

Literaturverzeichnis

- [1] ALSINA, J. ; YOKUM, T. S. ; ALBERICIO, F. ; BARANY, G.: Backbone amide linker (BAL) strategy for N-alpha-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) solid-phase synthesis of unprotected peptide p-nitroanilides and thioesters. In: *Journal of Organic Chemistry* 64 (1999), Nr. 24, S. 8761–8769
- [2] ALSINA, J. ; YOKUM, T. S. ; ALBERICIO, F. ; BARANY, G.: A modified Backbone Amide Linker (BAL) solid-phase peptide synthesis strategy accommodating prolyl, N-alkylamino acyl, or histidyl derivatives at the C-terminus. In: *Tetrahedron Letters* 41 (2000), Nr. 38, S. 7277–7280
- [3] ARSEQUELL, G. ; GONZALEZ, A. ; VALENCIA, G.: Visible Light promoted organic reaction on a solid support. In: *Tetrahedron Letters* 42 (2001), Nr. 14, S. 2685–2687
- [4] BACKES, B. J. ; ELLMAN, J. A.: An alkanesulfonamide "safety-catch" linker for solid-phase synthesis. In: *Journal of Organic Chemistry* 64 (1999), Nr. 7, S. 2322–2330
- [5] BACKES, B. J. ; VIRGILIO, A. A. ; ELLMAN, J. A.: Activation method to prepare a highly reactive acyl-sulfonamide "safety-catch" linker for solid-phase synthesis. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), Nr. 12, S. 3055–3056
- [6] BANG, D. ; KENT, S. B. H.: A One-Pot Total Synthesis of Crambin. In: *Angewandte Chemie* 116 (2004), Nr. 19, S. 2588–2592; *Angewandte Chemie International Edition* 43 (2004) Nr. 19, S. 2534–2538
- [7] BANG, D. ; PENTELUTE, B. L. ; KENT, S. B. H.: Kinetically Controlled Ligation for the Convergent Chemical Synthesis of Proteins. In: *Angewandte Chemie* 118 (2008), Nr. 24, S. 4089–4092; *Angewandte Chemie International Edition* 45 (2008) Nr. 24, S. 3985–3988
- [8] BARK, S. J. ; KENT, S. B. H.: Engineering an unnatural N^α-anchored disulfide into BPTI by total chemical synthesis: structural and functional consequences. In: *FEBS Letters* 460 (1999), Nr. 1, S. 67–76
- [9] BARLOS, K. ; GATOS, D. ; KALLITSIS, J. ; G., Papahotiu ; P., Soiriu ; Y., Wenqing ; W., Schäfer: Darstellung geschützter Peptid-Fragmente unter Einsatz substituierter Triphenylmethyl-Harze. In: *Tetrahedron Letters* 30 (1989), Nr. 30, S. 3943–3946
- [10] BARLOS, K. ; GATOS, D. ; PAPAPHOTIOU, G. ; SCHÄFER, W.: Synthese von Calcitonin-Derivaten durch Fragmentkondensation in Lösung und am 2-Chlortrityl-Harz. In: *Liebigs Annalen Der Chemie* (1993), Nr. 3, S. 215–220
- [11] BATES, D. ; CHAMBERS, J. ; DALGAARD, P. ; FALCON, S. ; GENTLEMAN, R. ; HORNIK, K. ; IACUS, S. ; IHAKA, R. ; LEISCH, F. ; LUMLEY, T. ; MAECHLER, M. ; MURDOCH, D. ; MURRELL, P. ; PLUMMER, M. ; RIPLEY, B. ; SARKAR, D. ; LANG, D. T. ; TIERNEY, L. ; URBANEK, S.: *The R Project for Statistical Computing*. Version: 2009. <http://www.r-project.org/>. Website
- [12] BENNETT, C. S. ; DEAN, S. M. ; PAYNE, R. J. ; FICHT, S. ; BRIK, A. ; WONG, C. H.: Sugar-Assisted Glycopeptide Ligation with Complex Oligosaccharides: Scope and Limitations. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008), Nr. 36, S. 11945–11952
- [13] BLAKE, J. ; LI, C. H.: New Segment-Coupling Method for Peptide-Synthesis in Aqueous-Solution - Application to Synthesis of Human [Gly17]-Beta-Endorphin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78 (1981), Nr. 7, S. 4055–4058
- [14] BLANCO-CANOSA, J. B. ; DAWSON, P. E.: An efficient Fmoc-SPPS approach for the generation of thioester peptide precursors for use in native chemical ligation. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 36, S. 6957–6961; *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 36, S. 6851–6855
- [15] BOCHAR, D. A. ; TABERNERO, L. ; STAUFFACHER, C. V. ; RODWELL, V. W.: Aminoethylcysteine can replace the function of the essential active site lysine of Pseudomonas mevalonii 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 28, S. 8879–8883

- [16] BORGIA, J. A. ; FIELDS, G. B.: Chemical synthesis of proteins. In: *Trends in Biotechnology* 18 (2000), Nr. 6, S. 243–251
- [17] BOTTI, P. ; CARRASCO, M. R. ; KENT, S. B. H.: Native chemical ligation using removable N-alpha-(1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries. In: *Tetrahedron Letters* 42 (2001), Nr. 10, S. 1831–1833
- [18] BOTTI, P. ; TCHERTCHIAN, S.: *Side Chain Assited Ligation*. WO2006133962. 2006
- [19] BOTTI, P. ; VILLAIN, M. ; MANGANIELLO, S. ; GAERTNER, H.: Native chemical ligation through in situ O to S acyl shift. In: *Organic Letters* 6 (2004), Nr. 26, S. 4861–4864
- [20] BRAIBANTE, M. E. F. ; S., Braibante H. ; R., Costenaro E.: The Use of Curtius Rearrangement in the Synthesis of 4-Aminothiazolidines. In: *Synthesis* 1999 (1999), Nr. 6, S. 943–946
- [21] BRASK, J. ; ALBERICIO, F. ; JENSEN, K. J.: Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters by masking as trithioortho esters. In: *Organic Letters* 5 (2003), Nr. 16, S. 2951–2953
- [22] BRENNER, M. ; ZIMMERMANN, J. P. ; WEHRMÜLLER, J. ; QUITT, P. ; PHOTAKI, I.: Eine neue Umlagerungsreaktion und ein neues Prinzip zum Aufbau von Peptidketten. In: *Experientia* 11 (1955), Nr. 10, S. 397–399
- [23] BRIK, A. ; FICHT, S. ; YANG, Y. Y. ; BENNETT, C. S. ; WONG, C. H.: Sugar-assisted ligation of N-linked glycopeptides with broad sequence tolerance at the ligation junction. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006), Nr. 46, S. 15026–15033
- [24] BRIK, A. ; YANG, Y. Y. ; FICHT, S. ; WONG, C. H.: Sugar-assisted glycopeptide ligation. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006), Nr. 17, S. 5626–5627
- [25] BU, X. Z. ; XIE, G. Y. ; LAW, C. W. ; GUO, Z. H.: An improved deblocking agent for direct Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters. In: *Tetrahedron Letters* 43 (2002), Nr. 13, S. 2419–2422
- [26] BUNCE, R. A. ; PIERCE, J. D.: A One-Step Preparation of (E)-4-Mercapto-2-Butenoic Esters and Nitriles Relative Michael Reactivities in Simple Unsaturated Systems. In: *Tetrahedron Letters* 27 (1986), Nr. 46, S. 5583–5586
- [27] CAMARERO, J. A. ; HACKEL, B. J. ; YOREO, J. J. ; MITCHELL, A. R.: Fmoc-based synthesis of peptide alpha-thioesters using an aryl hydrazine support. In: *Journal of Organic Chemistry* 69 (2004), Nr. 12, S. 4145–4151
- [28] CANNE, L. E. ; BARK, S. J. ; KENT, S. B. H.: Extending the applicability of native chemical ligation. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), Nr. 25, S. 5891–5896
- [29] CARDONA, V. M. F. ; HARTLEY, O. ; BOTTI, P.: Synthesis of cyclic peptides from unprotected precursors using removable N-alpha-(1-(4-methoxyphenyl)-2-mercaptoethyl) auxiliary. In: *Journal of Peptide Research* 61 (2003), Nr. 3, S. 152–157
- [30] CARPINO, L. A.: 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (1993), Nr. 10, S. 4397–4398
- [31] CHATGILIALOGLU, C.: The tris(trimethylsilyl)silane/thiol reducing system: A tool for measuring rate constants for reactions of carbon-centered radicals with thiols. In: *Helvetica Chimica Acta* 89 (2006), Nr. 10, S. 2387–2398
- [32] CHATGILIALOGLU, C. ; FERRERI, C. ; BAZZANINI, R. ; GUERRA, M. ; CHOI, S. Y. ; EMANUEL, C. J. ; HORNER, J. H. ; NEWCOMB, M.: Models of DNA C1 ' radicals. Structural, spectral, and chemical properties of the thyminylmethyl radical and the 2 '-deoxyuridin-1 '-yl radical. In: *Journal of the American Chemical Society* 122 (2000), Nr. 39, S. 9525–9533
- [33] CHATTERJEE, C. ; MCGINTY, R. K. ; PELLOIS, J. P. ; MUIR, T. W.: Auxiliary-mediated site-specific peptide ubiquitylation. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Nr. 16, S. 2872–2876; *Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) Nr. 16, S. 2814–2818
- [34] CHEN, J. ; WAN, Q. ; YUAN, Y. ; ZHU, J. ; J., Danishefsky S.: Native Chemical Ligation at Valine: A Contribution to Peptide and Glycopeptide Synthesis. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 47, S. 8649–8652; *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 47, S. 8521–8524

- [35] CLIPPINGDALE, A. B. ; BARROW, C. J. ; WADE, J. D.: Peptide thioester preparation by Fmoc solid phase peptide synthesis for use in native chemical ligation. In: *Journal of Peptide Science* 6 (2000), Nr. 5, S. 225–234
- [36] COIN, I. ; BEYERMANN, M. ; BIENERT, M.: Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. In: *Nature Protocols* 2 (2007), Nr. 12, S. 3247–3256
- [37] CONSORTIUM, International Human Genome S.: Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (2001), Nr. 6822, S. 860–922
- [38] CRICH, D. ; BANERJEE, A.: Native Chemical Ligation at Phenylalanine. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 33, S. 10064–10065
- [39] CUESTA, J. ; ARSEQUELL, G. ; VALENCIA, G. ; GONZALEZ, A.: Photochemical desulfurization of thiols and disulfides. In: *Tetrahedron-Asymmetry* 10 (1999), Nr. 14, S. 2643–2646
- [40] DAWSON, P. E. ; CHURCHILL, M. J. ; GHADIRI, M. R. ; KENT, S. B. H.: Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives. In: *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997), Nr. 19, S. 4325–4329
- [41] DAWSON, P. E. ; MUIR, T. W. ; CLARK-LEWIS, I. ; KENT, S. B. H.: Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. In: *Science* 266 (1994), Nr. 5186, S. 776–779
- [42] DESANTIS, G. ; BERGLUND, P. ; STABILE, M. R. ; GOLD, M. ; JONES, J. B.: Site-directed mutagenesis combined with chemical modification as a strategy for altering the specificity of the S-1 and S-1' pockets of subtilisin Bacillus lentus. In: *Biochemistry* 37 (1998), Nr. 17, S. 5968–5973
- [43] DIRKSEN, A. ; DAWSON, P. E.: Expanding the scope of chemoselective peptide ligations in chemical biology. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (2008), Nr. 6, S. 760–766
- [44] DUDKIN, V. Y. ; ORLOVA, M. ; GENG, X. D. ; MANDAL, M. ; OLSON, W. C. ; DANISHEFSKY, S. J.: Toward fully synthetic carbohydrate-based HIV antigen design: On the critical role of bivalency. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 31, S. 9560–9562
- [45] EBI: *Genome Reviews: Release Statistics Bacteriophage Genomes*. Version: 2009. <http://www.ebi.ac.uk/GenomeReviews/stats/phage/>. Website
- [46] EBI: *Genome Reviews: Release Statistics Cellular Organisms*. Version: 2009. <http://www.ebi.ac.uk/GenomeReviews/stats/cellular/>. Website
- [47] EBI: *UniProtKB/TrEMBL - Current Release Statistics*. Version: 2009. <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats/>. Website
- [48] EGDELKRAUT-GOTTANKA, R. von ; KLOSE, A. ; BECK-SICKINGER, A. G. ; BEYERMANN, M.: Peptide α thioester formation using standard Fmoc-chemistry. In: *Tetrahedron Letters* 44 (2003), Nr. 17, S. 3551–3554
- [49] FICHT, S. ; PAYNE, R. J. ; BRIK, A. ; WONG, C. H.: Zuckervermittelte Peptidverknüpfung der zweiten Generation: eine Methode zur Synthese von cysteinhaltigen Glycopeptiden. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Nr. 31, S. 6079–6083; Second-Generation Sugar-Assisted Ligation: A Method for the Synthesis of Cysteine-Containing Glycopeptides. *Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) Nr. 31, S. 5975–5979
- [50] FICHT, S. ; PAYNE, R. J. ; GUY, R. T. ; WONG, C. H.: Solid-Phase Synthesis of Peptide and Glycopeptide Thioesters through Side-Chain-Anchoring Strategies. In: *Chemistry - A European Journal* 14 (2008), Nr. 14, S. 3620–3629
- [51] FUTAKI, S. ; SOGAWA, K. ; MARUYAMA, J. ; ASAHARA, T. ; NIWA, M. ; HOJO, H.: Preparation of peptide thioesters using Fmoc-solid-phase peptide synthesis and its application to the construction of a template-assembled synthetic protein (TASP). In: *Tetrahedron Letters* 38 (1997), Nr. 35, S. 6237–6240
- [52] GERMAIN, J. ; DESLONGCHAMPS, P.: Total Synthesis of (\pm)-Momilactone A. In: *The Journal of Organic Chemistry* 67 (2002), Nr. 15, S. 5269–5278
- [53] GIESELMAN, M. D. ; XIE, L. L. ; DONK, W. A. d.: Synthesis of a selenocysteine-containing peptide by native chemical ligation. In: *Organic Letters* 3 (2001), Nr. 9, S. 1331–1334

- [54] GONZALEZ, A. ; VALENCIA, G.: Photochemical desulfurization of L-cysteine derivatives. In: *Tetrahedron-Asymmetry* 9 (1998), Nr. 16, S. 2761–2764
- [55] Kapitel PROTECTION FOR THE THIOL GROUP. In: GREENE, T. W. ; WUTS, P. G.: *PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS*. 3rd. WILEY-INTERSCIENCE, 1999, S. 460–461
- [56] HAASE, C. ; ROHDE, H. ; SEITZ, O.: Native Chemische Verknüpfung mit Valin. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 44, S. 6912–6915; Native Chemical Ligation at Valine. *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 44, S. 6807–6810
- [57] HAASE, C. ; SEITZ, O.: Mehr Spielraum für die native chemische Peptidkupplung. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 9, S. 1575–1579; Extending the scope of native chemical peptide coupling. *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 9, S. 1553–1556
- [58] HAASE, C. ; SEITZ, O.: Internal Cysteine Accelerates Thioester-Based Peptide Ligation. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2009 (2009), Nr. 13, S. 2096–2101
- [59] HACKENBERGER, C. P. R. ; SCHWARZER, D.: Chemoselektive Ligations- und Modifikationsstrategien für Peptide und Proteine. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 52, S. 10182–10228; Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 52, S. 10030–10074
- [60] HACKENG, T. M. ; GRIFFIN, J. H. ; DAWSON, P. E.: Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), Nr. 18, S. 10068–10073
- [61] HILL, A. ; BOLAND, M. ; KARAS, J. ; WALL, V. ; BARNHAM, K. ; COLLINS, S. ; SCANLON, D.: Investigation of the structure of the N-terminal region of prion protein (PrP) via the microwave synthesis of peptide fragments up to 111 amino acids in length. In: *Journal of Peptide Science* 14 (2008), Nr. 8, S. 90–91
- [62] HOFFMANN, F. W. ; ESS, R. J. ; SIMMONS, T. C. ; HANZEL, R. S.: The Desulfurization of Mercaptans with Trialkyl Phosphites. In: *Journal of the American Chemical Society* 78 (1956), Nr. 24, S. 6414–6414
- [63] HOJO, H. ; AIMOTO, S.: Polypeptide-Synthesis Using the S-Alkyl Thioester of a Partially Protected Peptide Segment - Synthesis of the DNA-Binding Domain of C-Myb Protein (142-193)-Nh2. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 64 (1991), Nr. 1, S. 111–117
- [64] HOJO, H. ; AIMOTO, S.: Polypeptide-Synthesis Using the S-Alkyl Thioester of a Partially Protected Peptide Segment - Synthesis of the DNA-Binding Domain of C-Myb Protein (142-193)-Nh2. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 64 (1991), Nr. 1, S. 111–117
- [65] HOJO, H. ; HAGINOYA, E. ; MATSUMOTO, Y. ; NAKAHARA, Y. ; NABESHIMA, K. ; TOOLE, B. P. ; WATANABE, Y.: The first synthesis of peptide thioester carrying N-linked core pentasaccharide through modified Fmoc thioester preparation: synthesis of an N-glycosylated Ig domain of emmprin. In: *Tetrahedron Letters* 44 (2003), Nr. 14, S. 2961–2964
- [66] HOJO, H. ; MURASAWA, Y. ; KATAYAMA, H. ; OHIRA, T. ; NAKAHARAA, Y. ; NAKAHARA, Y.: Application of a novel thioesterification reaction to the synthesis of chemokine CCL27 by the modified thioester method. In: *Organic & Biomolecular Chemistry* 6 (2008), Nr. 10, S. 1808–1813
- [67] HOJO, H. ; ONUMA, Y. ; AKIMOTO, Y. ; NAKAHARA, Y.: N-alkyl cysteine-assisted thioesterification of peptides. In: *Tetrahedron Letters* 48 (2007), Nr. 1, S. 25–28
- [68] HONDAL, R. J. ; NILSSON, B. L. ; RAINES, R. T.: Selenocysteine in native chemical ligation and expressed protein ligation. In: *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001), Nr. 21, S. 5140–5141
- [69] INGENITO, R. ; BIANCHI, E. ; FATTORI, D. ; PESSI, A.: Solid phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/t-Bu chemistry. In: *Journal of the American Chemical Society* 121 (1999), Nr. 49, S. 11369–11374
- [70] INGENITO, R. ; WENSCHUH, H.: Effect of copper salts on peptide bond formation using peptide thioesters. In: *Organic Letters* 5 (2003), Nr. 24, S. 4587–4590
- [71] IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry; Recommendations on Organic & Biochemical Nomenclature, Symbols & Terminology etc. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides*. Version: 2009. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/AA1n2.html>. Website

- [72] JOHNSON, E. C. B. ; KENT, S. B. H.: Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006), Nr. 20, S. 6640–6646
- [73] KAWAKAMI, T. ; AIMOTO, S.: A photoremovable ligation auxiliary for use in polypeptide synthesis. In: *Tetrahedron Letters* 44 (2003), Nr. 32, S. 6059–6061
- [74] KAWAKAMI, T. ; AKAJI, K. ; AIMOTO, S.: Peptide Bond Formation Mediated by 4,5-Dimethoxy-2-mercaptobenzylamine after Periodate Oxidation of the N-Terminal Serine Residue. In: *Organic Letters* 3 (2001), Nr. 9, S. 1403–1405
- [75] KAWAKAMI, T. ; SUMIDA, M. ; NAKAMURA, K. ; VORHERR, T. ; AIMOTO, S.: Peptide thioester preparation based on an N-S acyl shift reaction mediated by a thiol ligation auxiliary. In: *Tetrahedron Letters* 46 (2005), Nr. 50, S. 8805–8807
- [76] KEMP, D. S. ; BERNSTEIN, Z. W. ; MCNEIL, G. N.: Nucleophilic Reactivity of Peptides toward 2-Acyloxy-N-Ethylbenzamides – Utility of Free Peptides as Nucleophiles in Amide Bond Forming Reactions. In: *Journal of Organic Chemistry* 39 (1974), Nr. 19, S. 2831–2835
- [77] KEMP, D. S. ; CAREY, R. I.: Synthesis of a 39-Peptide and a 25-Peptide by Thiol Capture Ligations – Observation of a 40-Fold Rate Acceleration of the Intramolecular O,N-Acyl-Transfer Reaction between Peptide-Fragments Bearing Only Cysteine Protective Groups. In: *Journal of Organic Chemistry* 58 (1993), Nr. 8, S. 2216–2222
- [78] KEMP, D. S. ; CHOONG, S. L. H. ; PEKAAR, J.: Rate Constants for Peptide Para-Nitrophenyl Ester Coupling Reactions in Dimethylformamide – Model for Steric Interactions in Peptide-Bond Forming Transition-State. In: *Journal of Organic Chemistry* 39 (1974), Nr. 26, S. 3841–3847
- [79] KENNER, G. W. ; MCDERMOT, JR. ; SHEPPARD, R. C.: Safety Catch Principle in Solid Phase Peptide Synthesis. In: *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* (1971), Nr. 12, S. 636–637
- [80] KENT, S. B. H.: Total chemical synthesis of proteins. In: *Chemical Society Reviews* 38 (2009), Nr. 2, S. 338–351
- [81] KLEINEWEISCHEDE, R. ; HACKENBERGER, C. P. R.: Chemoselektive Peptidcyclisierung über spurlose Staudinger-Ligation. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 32, S. 6073–6077; Chemoselective peptide cyclisation by traceless Staudinger Ligation. *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 32, S. 5984–5988
- [82] KOCHENDOERFER, G. G. ; CHEN, S. Y. ; MAO, F. ; CRESSMAN, S. ; TRAVIGLIA, S. ; SHAO, H. Y. ; HUNTER, C. L. ; LOW, D. W. ; CAGLE, E. N. ; CARNEVALI, M. ; GUERIGUIAN, V. ; KEOGH, P. J. ; PORTER, H. ; STRATTON, S. M. ; WIEDEKE, M. C. ; WILKEN, J. ; TANG, J. ; LEVY, J. J. ; MIRANDA, L. P. ; CRNOGORAC, M. M. ; KALBAG, S. ; BOTTI, P. ; SCHINDLER-HORVAT, J. ; SAVATSKI, L. ; ADAMSON, J. W. ; KUNG, A. ; KENT, S. B. H. ; BRADBURN, J. A.: Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. In: *Science* 299 (2003), Nr. 5608, S. 884–887
- [83] KÖHN, M. ; BREINBAUER, R.: Die Staudinger-Ligation – ein Geschenk für die Chemische Biologie. In: *Angewandte Chemie* 116 (2004), Nr. 52, S. 3168–3178; The Staudinger ligation – A gift to chemical biology. *Angewandte Chemie International Edition* 43 (2004) Nr. 24, S. 3106–3116
- [84] KONING, M. C. ; FILIPPOV, D. V. ; MAREL, G. A. d. ; BOOM, J. H. ; OVERHAND, M.: Synthesis of peptide-PNA-peptide conjugates by semi-solid-phase chemical ligation combined with deactivation/capture of excess reactants. In: *European Journal of Organic Chemistry* (2004), Nr. 4, S. 850–857
- [85] KORNBLUM, N.: The synthesis of aliphatic and alicyclic nitro compounds. In: COPE, A. C. (Hrsg.): *Organic Reactions*. John Wiley, Inc., 1962, S. 101–156
- [86] KUMAR, K. S. A. ; HARPAZ, Z. ; HAJ-YAHYA, M. ; BRIK, A.: Side-chain assisted ligation in protein synthesis. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009), Nr. 14, S. 3870–3874
- [87] LEE, H. L. ; BAGGIOLINI, E. G. ; USKOKOVIC, M. R.: Synthesis of D-Biotin from Cysteine. In: *Tetrahedron* 43 (1987), Nr. 21, S. 4887 – 4903
- [88] LELIÈVRE, D. ; BARTA, P. ; AUCAGNE, V. ; DELMAS, A. F.: Preparation of peptide thioesters using Fmoc strategy through hydroxyl side chain anchoring. In: *Tetrahedron Letters* 49 (2008), Nr. 25, S. 4016–4019

- [89] LI, X. Q. ; KAWAKAMI, T. ; AIMOTO, S.: Direct preparation of peptide thioesters using an Fmoc solid-phase method. In: *Tetrahedron Letters* 39 (1998), Nr. 47, S. 8669–8672
- [90] LIU, C. F. ; RAO, C. ; TAM, J. P.: Acyl disulfide-mediated intramolecular acylation for orthogonal coupling between unprotected peptide segments. Mechanism and application. In: *Tetrahedron Letters* 37 (1996), Nr. 7, S. 933–936
- [91] LOW, D. W. ; HILL, M. G. ; CARRASCO, M. R. ; KENT, S. B. H. ; BOTTI, P.: Total synthesis of cytochrome b562 by native chemical ligation using a removable auxiliary. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001), Nr. 12, S. 6554–6559
- [92] LUTSKY, M. Y. ; NEPOMNIASCHIY, N. ; BRIK, A.: Peptide ligation via side-chain auxiliary. In: *Chemical Communications* (2008), Nr. 10, S. 1229–1231
- [93] LUZZIO, F. A.: The Henry reaction: recent examples. In: *Tetrahedron* 57 (2001), Nr. 6, S. 915–945
- [94] MACMILLAN, D. ; ANDERSON, D. W.: Rapid synthesis of acyl transfer auxiliaries for cysteine-free native glycopeptide ligation. In: *Organic Letters* 6 (2004), Nr. 25, S. 4659–4662
- [95] MARINZI, C. ; BARK, S. J. ; OFFER, J. ; DAWSON, P. E.: A new scaffold for amide ligation. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001), Nr. 9, S. 2323–2328
- [96] MARINZI, C. ; OFFER, J. ; LONGHI, R. ; DAWSON, P. E.: An o-nitrobenzyl scaffold for peptide ligation: synthesis and applications. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004), Nr. 10, S. 2749–2757
- [97] MCGINTY, R. K. ; KIM, J. ; CHATTERJEE, C. ; ROEDER, R. G. ; MUIR, T. W.: Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. In: *Nature* 453 (2008), Nr. 7196, S. 812–U12
- [98] MENDE, F. ; SEITZ, O.: Festphasensynthese von C-terminalen Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Nr. 24, S. 4661–4665; Solid-phase synthesis of peptide thioesters with self-purification. *Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) Nr. 24, S. 4577–4580
- [99] MENDE, F. ; SEITZ, O.: Automated Fmoc-based Solid-Phase Synthesis of Peptide Thioesters with Self-Purification. In: *Proceedings of the 9th German Peptide Symposium*, 2009, S. NN
- [100] MERRIFIELD, R. B.: Solid Phase Peptide Synthesis. I. Synthesis of a Tetrapeptide. In: *Journal of the American Chemical Society* 85 (1963), Nr. 14, S. 2149–2154
- [101] NAGAIKE, F. ; ONUMA, Y. ; KANAZAWA, C. ; HOJO, H. ; UEKI, A. ; NAKAHARA, Y.: Efficient microwave-assisted tandem N- to S-acyl transfer and thioester exchange for the preparation of a glycosylated peptide thioester. In: *Organic Letters* 8 (2006), Nr. 20, S. 4465–4468
- [102] NAGALINGAM, A. C. ; RADFORD, S. E. ; WARRINER, S. L.: Avoidance of epimerization in the synthesis of peptide thioesters using Fmoc protection. In: *Synlett* (2007), Nr. 16, S. 2517–2520
- [103] NILSSON, B. L. ; SOELLNER, M. B. ; T., Raines R.: Chemical Synthesis of Proteins. In: *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure* 34 (2005), Nr. , S. 91–118
- [104] OFFER, J. ; BODDY, C. N. C. ; DAWSON, P. E.: Extending Synthetic Access to Proteins with a Removable Acyl Transfer Auxiliary. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), Nr. 17, S. 4642–4646
- [105] OFFER, J. ; DAWSON, P. E.: N^α-2-Mercaptobenzylamine-Assisted Chemical Ligation. In: *Organic Letters* 2 (2000), Nr. 1, S. 23–26
- [106] OHTA, Y. ; ITOH, S. ; SHIGENAGA, A. ; SHINTAKU, S. ; FUJII, N. ; OTAKA, A.: Cysteine-derived S-protected oxazolidinones: Potential chemical devices for the preparation of peptide thioesters. In: *Organic Letters* 8 (2006), Nr. 3, S. 467–470
- [107] OKAMOTO, R. ; KAJIHARA, Y.: Uncovering a latent ligation site for glycopeptide synthesis. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 29, S. 5482–5486; *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 29, S. 5402–5406
- [108] OKAMOTO, R. ; SOUMA, S. ; KAJIHARA, Y.: Efficient Substitution Reaction from Cysteine to the Serine Residue of Glycosylated Polypeptide: Repetitive Peptide Segment Ligation Strategy and the Synthesis of Glycosylated Tetracontapeptide Having Acid Labile Sialyl-T-N Antigens. In: *Journal of Organic Chemistry* 74 (2009), Nr. 6, S. 2494–2501

- [109] OLLIVIER, N. ; BEHR, J. B. ; EL-MAHDI, O. ; BLANPAIN, A. ; MELNYK, O.: Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters using an intramolecular N,S-acyl shift. In: *Organic Letters* 7 (2005), Nr. 13, S. 2647–2650
- [110] PACHAMUTHU, K. ; SCHMIDT, R. R.: Synthesis of methionine containing peptides related to native chemical ligation. In: *Synlett* (2003), Nr. 5, S. 659–662
- [111] PAYNE, R. J. ; FICHT, S. ; GREENBERG, W. A. ; WONG, C. H.: Cysteine-free peptide and glycopeptide ligation by direct aminolysis. In: *Angewandte Chemie* 120 (2008), Nr. 33, S. 4483–4487; *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) Nr. 23, S. 4411–4415
- [112] PAYNE, R. J. ; FICHT, S. ; TANG, S. ; BRIK, A. ; YANG, Y. Y. ; CASE, D. A. ; WONG, C. H.: Extended sugar-assisted glycopeptide ligations: Development, scope, and applications. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 44, S. 13527–13536
- [113] PELLOIS, J. P. ; MUIR, T. W.: A Ligation and Photorelease Strategy for the Temporal and Spatial Control of Protein Function in Living Cells. In: *Angewandte Chemie* 117 (2005), Nr. 35, S. 5859–5863; *Angewandte Chemie International Edition* 44 (2005) Nr. 35, S. 5713–5717
- [114] PENTELUTE, B. L. ; KENT, S. B. H.: Selective desulfurization of cysteine in the presence of Cys(Acm) in polypeptides obtained by native chemical ligation. In: *Organic Letters* 9 (2007), Nr. 4, S. 687–690
- [115] PUTNAM, C.: *PROTEIN CALCULATOR v3.3*. Version: 2009. <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>. Website
- [116] QUADERER, R. ; SEWING, A. ; HILVERT, D.: Selenocysteine-mediated native chemical ligation. In: *Helvetica Chimica Acta* 84 (2001), Nr. 5, S. 1197–1206
- [117] REICH, H. J.: *Bordwell pKa table*. Version: 2009. <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/>. Website
- [118] RICHTER, Lutz S. ; JR., James C. M. ; GADEK, Thomas R.: Two new procedures for the introduction of benzyl-type protecting groups for thiols. In: *Tetrahedron Letters* 35 (1994), Nr. 11, S. 1631 – 1634
- [119] RINIKER, B. ; FLÖRSHEIMER, A. ; FRETZ, H. ; SIEBER, P. ; KAMBER, B.: A General Strategy for the Synthesis of Large Peptides - the Combined Solid-Phase and Solution Approach. In: *Tetrahedron* 49 (1993), Nr. 41, S. 9307–9320
- [120] RÖGLIN, L. ; AHMADIAN, M. R. ; SEITZ, O.: DNA-gesteuerte reversible Schaltung der Konformation und der Bioaktivität eines Peptids. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Nr. 15, S. 2759–2763; DNA-Controlled Reversible Switching of Peptide Conformation and Bioactivity. *Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) Nr. 15, S. 2704–2707
- [121] SAPORITO, A. ; MARASCO, D. ; CHAMBERY, A. ; BOTTI, P. ; MONTI, S. M. ; PEDONE, C. ; RUVO, M.: The Chemical Synthesis of the GstI Protein by NCL on a X-Met Site. In: *Biopolymers* 83 (2006), Nr. 5, S. 508–518
- [122] SEWING, A. ; HILVERT, D.: Fmoc-kompatible Festphasensynthese von langen, C-terminalen Peptidthioestern. In: *Angewandte Chemie* 113 (2001), Nr. 18, S. 3503–3505; Fmoc-compatible solid-phase peptide synthesis of long C-terminal peptide thioesters. *Angewandte Chemie International Edition* 40 (2001) Nr. 18, S. 3395–3396
- [123] SHAO, Y. ; LU, W. Y. ; KENT, S. B. H.: A novel method to synthesize cyclic peptides. In: *Tetrahedron Letters* 39 (1998), Nr. 23, S. 3911–3914
- [124] SHIN, Y. ; WINANS, K. A. ; BACKES, B. J. ; KENT, S. B. H. ; ELLMAN, J. A. ; BERTOZZI, C. R.: Fmoc-based synthesis of peptide- α thioesters: Application to the total chemical synthesis of a glycoprotein by native chemical ligation. In: *Journal of the American Chemical Society* 121 (1999), Nr. 50, S. 11684–11689
- [125] SOEDE-HUIJBREGTS, C. ; VAN LAREN, M. ; HULSBERGEN, F. B. ; RAAP, J. ; LUGTENBURG, J.: Improved specific synthesis of $[1^{15}\text{N}]$ - and $[3^{15}\text{N}]$ -L-histidine. In: *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 44 (2001), Nr. 12, S. 831–841
- [126] SOELLNER, M. B. ; TAM, A. ; RAINES, R. T.: Staudinger ligation of peptides at non-glycyl residues. In: *Journal of Organic Chemistry* 71 (2006), Nr. 26, S. 9824–9830

- [127] SWINNEN, D. ; HILVERT, D.: Facile, Fmoc-compatible solid-phase synthesis of peptide C-terminal thioesters. In: *Organic Letters* 2 (2000), Nr. 16, S. 2439–2442
- [128] TAM, A. ; SOELLNER, M. B. ; RAINES, R. T.: Water-soluble phosphinothiols for traceless Staudinger ligation and integration with expressed protein ligation. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 37, S. 11421–11430
- [129] TAM, J. P. ; LU, Y. A. ; LIU, C. F. ; SHAO, J.: Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), Nr. 26, S. 12485–12489
- [130] TAM, J. P. ; YU, Q. T.: Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones. In: *Biopolymers* 46 (1998), Nr. 5, S. 319–327
- [131] TCHERTCHIAN, S. ; HARTLEY, O. ; BOTTI, P.: Synthesis of N-alpha-(1-phenyl-2-mercaptoethyl) amino acids, new building blocks for ligation and cyclization at non-cysteine sites: Scope and limitations in peptide synthesis. In: *Journal of Organic Chemistry* 69 (2004), Nr. 26, S. 9208–9214
- [132] THOMAS, G. L. ; PAYNE, R. J.: Phosphate-assisted peptide ligation. In: *Chemical Communications* (2009), Nr. 28, S. 4260–4262
- [133] TOFTENG, A. P. ; SØRENSEN, K. K. ; CONDE-FRIEBOES, K. W. ; HOEG-JENSEN, T. ; J., Jensen K.: Fmoc Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Peptide Thioesters by Formation of a Backbone Pyroglutamyl Imide Moiety. In: *Angewandte Chemie* (2009). <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903710>. – DOI 10.1002/ange.200903710
- [134] TORU, T. ; NISHIGAKI, M. ; SEKO, T. ; KANEFUSA, T. ; MAEKAWA, E.: A Convenient Synthesis of S-Acyl Phenylselenosulfides. In: *Synthesis* 1985 (1985), Nr. 9, S. 878–879
- [135] TORU, T. ; SEKO, T. ; MAEKAWA, E. ; UENO, Y.: Reaction of Olefins with Se-Phenyl(Selenothioperoxy)benzoate: A New Anti-Markownikoff Benzeneselenenylation. In: *Journal of the Chemical Society - Perkin Transaction I* 1988 (1988), Nr. 3, S. 575–581
- [136] TULLA-PUCHE, J. ; BARANY, G.: On-resin native chemical ligation for cyclic peptide synthesis. In: *Journal of Organic Chemistry* 69 (2004), Nr. 12, S. 4101–4107
- [137] VALIYAVEETIL, F. I. ; MACKINNON, R. ; MUIR, T. W.: Semisynthesis and Folding of the Potassium Channel KcsA. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), Nr. 31, S. 9113–9120
- [138] VILLAIN, M. ; GAERTNER, H. ; BOTTI, P.: Native Chemical Ligation with Aspartic and Glutamic Acids as C-Terminal Residues: Scope and Limitations. In: *European Journal of Organic Chemistry* (2003), Nr. 17, S. 3267–3272
- [139] WALLING, C. ; BASEDOW, O. H. ; SAVAS, E. S.: Some Extensions of the Reaction of Trivalent Phosphorus Derivatives with Alkoxy and Thiyl Radicals - a New Synthesis of Thioesters. In: *Journal of the American Chemical Society* 82 (1960), Nr. 9, S. 2181–2184
- [140] WALLING, C. ; RABINOWITZ, R.: The Reaction of Thiyl Radicals with Trialkyl Phosphites. In: *Journal of the American Chemical Society* 79 (1957), Nr. 19, S. 5326–5326
- [141] WAN, Q. ; DANISHEFSKY, S. J.: Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: A powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Nr. 48, S. 9408–9412; *Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) Nr. 48, S. 9248–9252
- [142] WIELAND, T. ; BOKELMANN, E. ; BAUER, L. ; LANG, H. U. ; LAU, H.: Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung: Bildung von S-Haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. In: *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 583 (1953), Nr. 2, S. 129–149
- [143] WU, B. ; CHEN, J. H. ; WARREN, J. D. ; CHEN, G. ; HUA, Z. H. ; DANISHEFSKY, S. J.: Building complex glycopeptides: Development of a cysteine-free native chemical ligation protocol. In: *Angewandte Chemie* 118 (2006), Nr. 25, S. 4222–4231; *Angewandte Chemie International Edition* 45 (2006) Nr. 25, S. 4116–4125
- [144] YAN, L. Z. ; DAWSON, P. E.: Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization. In: *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001), Nr. 4, S. 526–533

- [145] YANG, Y. Y. ; FICHT, S. ; BRIK, A. ; WONG, C. H.: Sugar-assisted ligation in glycoprotein synthesis. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 24, S. 7690–7701
- [146] ZHANG, L. S. ; TAM, J. P.: Orthogonal coupling of unprotected peptide segments through histidyl amino terminus. In: *Tetrahedron Letters* 38 (1997), Nr. 1, S. 3–6
- [147] ZINDEL, J. ; MEIJERE, A. de: A Short and Efficient Diastereoselective Synthesis of 2'-Substituted 2-Cyclopropylglycines. In: *Synthesis* 1994 (1994), Nr. 2, S. 190–194

Abbildungsverzeichnis

2.1	Grundlegende Experimente	4
2.2	„Prior-Thiol-Capture“-Strategie nach Kemp <i>et al.</i>	5
2.3	Mechanismus der nativen chemischen Verknüpfung	6
2.4	Alternative Ligationsstrategien	10
2.5	Alkylierung von Ligationsprodukten.	11
2.6	Überführung von Cystein in Serin	12
2.7	Cystein-freie Ligation auf der Basis von Auxiliaren	13
2.8	Abspaltung des Mercaptobenzylauxiliars	15
2.9	Mechanismus der metall-freien Entschwefelung	17
2.10	Ligation mit Seitenketten-verknüpften Auxiliaren	19
2.11	Mechanismus der „spurlosen“ Staudinger Ligation	20
3.1	Konzept der Ligation mit basen-labilen Auxiliaren	21
3.2	Ligations-Entschwefelungs-Strategie	22
3.3	Ligation mit internem Cystein	23
4.1	Konzept der Ligation mit basenlabilem Auxiliar	26
4.2	Strategien für die Synthese eines Nitroauxiliarbausteines	27
4.3	Schlüsselintermediat: (3-Nitroallyl)(trityl)sulfan	28
4.4	Syntheseroute mit 3-Brom-1-nitroprop-1-en 71	28
4.5	Mechanismus der Bildung des Konstitutionsisomers 84	29
4.6	HMBC-Spektrum der Verbindung 84	30
4.7	Reaktion Bn-Gly-OH 88 / 3-Brom-1-nitroprop-1-en 71	31
4.8	Reaktion von TrtSH mit 3-Brom-1-nitroprop-1-en 71	31
4.9	Syntheseversuch: Ringöffnung von 2-Nitromethylthiiran 92	32
4.10	Verhalten von Epithiochlorhydrin bei Umsetzung mit NaI	33
4.11	Synthese eines Thiazolidinauxiliars	34
4.12	Synthese von <i>S</i> -Benzoylmercaptobutennitril	35
4.13	Synthese geschützter Mercaptobutennitrile	36
4.14	¹ H-NMR Spektren isomerer tritylierter Mercaptobutennitrile	37
4.15	¹ H-NMR Spektrum isomerer S-PMB-Mercaptobutennitrile	39
4.16	Synthese von H-Nag(PMB)-OH	40
4.17	Synthese geschützter Nitrilauxiliarglycine	40
4.18	Synthese des Modellpeptides mit Boc-Nag(PMB)-OH 118	41
4.19	Verhalten des acetylierten Nitrilauxiliars 119 gegenüber TFA	42
4.20	Verhalten von Fmoc-Nag(PMB)-OH gegenüber TFA	43
4.21	Mechanismus der Bildung von Amidauxiliar und Thiolacton	44

4.22	Synthese des Modellpeptides mit Fmoc-Nag(PMB)-OH 120 . . .	45
4.23	Synthese des unsymmetrischen Disulfids 137	47
4.24	Labilität des Nitrilauxiliars unter Ligationsbedingungen	48
4.25	Vollständiger Mechanismus der Thiolactonbildung	49
4.26	Synthese eines symmetrischen Disulfides	50
4.27	Stabilität des Butyramidauxiliars	51
4.28	Cystein-freie, auxiliar-vermittelte Ligation	52
4.29	Lewis-Säure-beeinflusste Auxiliarabspaltung	53
4.30	Abspaltung des Auxiliars - Einfluss von Magnesiumionen	54
4.31	Mechanismus der Abspaltung des Auxiliars	56
4.32	Auxiliarablösung: Vergleich Disulfid und Thiolacton	57
4.33	Optimierte Auxiliarabspaltung	58
4.34	Native chemische Verknüpfung mit Valin	59
4.35	Evaluierung von Thioladditiven und Puffersystemen	61
4.36	Optimierung der Penicillaminligation	62
4.37	Kontrollexperiment - Nachweis der Bedeutung der Thiofunktion .	63
4.38	Synthese des STAT-1- und des Syk-Kinase-Fragmentes	63
4.39	Penicillaminligation mit höherem sterischen Anspruch	65
4.40	Penicillaminligation mit hohem sterischen Anspruch	66
4.41	Metall-basierte Entschwefelung	67
4.42	Putativer Mechanismus der metall-freien Entschwefelung	68
4.43	Metall-freie Entschwefelung	69
4.44	Tetraederintermediate verschiedener Ligationsreaktionen	72
4.45	Schematischer Ablauf der Ligation mit internem Cystein	73
4.46	Beispiel-HPLC-Analytik für die Ligation mit internem Cystein . .	74
4.47	Ligation mit internem Cystein: Glycinpeptide	75
4.48	Ligation mit internem Cystein: Alaninpeptide	76
4.49	Ligation mit internem Cystein: Aspartatpeptide	77
4.50	Ligation mit internem Cystein: Asparagin-/Prolinpeptide	78
4.51	Verknüpfung von Prolin-Peptiden - optimierte Bedingungen . . .	79
5.1	Basen-labilem Auxiliar - Konzept	84
5.2	Basen-labiles Auxiliar - Monomersynthese	84
5.3	Basenlabiles Auxiliar - Modellpeptidsynthese	85
5.4	Basen-labiles Auxiliar - Ligation	86
5.5	Basen-labiles Auxiliar - Abspaltung	87
5.6	Ligations-Entschwefelungs-Strategie mit Penicillamin	87
5.7	Ligation mit internem Cystein	88
6.1	Auxiliar-vermittelte Ligation	121
6.2	Auxiliarabspaltung	122
6.3	Ligation H-LYKAG-SR 140 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152	127
6.4	Ligation H-LYKAH-SR 167 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152	127
6.5	Ligation H-LYKAM-SR 168 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152	127

6.6	Ligation H-LYKAL-SR 170 und H-PenRAEYS-NH ₂ 152	129
6.7	Ligation STAT-1 Segment 165 /Syk-Kinase Segment 166	129
6.8	Kontrollexperiment zur Penicillaminligation	130
6.9	Metall-bas. Desulf. 154 /Syk-Kinase Segment 166	130
6.10	Metall-freie Desulf. 154/172	132
6.11	Metall-freie Desulf. 176/179	132
6.12	Metall-freie Desulf. STAT-1 Seg. 165 /Syk-Kinase-Seg. 166	133
6.13	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-GCRAEYS-NH ₂ 195	138
6.14	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-GGCRAEYS-NH ₂ 196	138
6.15	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-GGGCRAEYS-NH ₂ 197	138
6.16	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-GGGGCRAEYS-NH ₂ 198	140
6.17	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-GGGGGCRAEYS-NH ₂ 199	140
6.18	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-GGGARAEYS-NH ₂ 200	140
6.19	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-ACRAEYS-NH ₂ 201	142
6.20	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGCRAEYS-NH ₂ 202	142
6.21	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGCRAEYS-NH ₂ 203	142
6.22	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGCRAEYS-NH ₂ 204	144
6.23	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGGCRAEYS-NH ₂ 205	144
6.24	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGGGCRAEYS-NH ₂ 206	144
6.25	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGARAEYS-NH ₂ 207	146
6.26	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGDCRAEYS-NH ₂ 208	146
6.27	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGDCCRAEYS-NH ₂ 209	146
6.28	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGDCRAEYS-NH ₂ 210	148
6.29	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGGDCRAEYS-NH ₂ 211	148
6.30	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGNCRAEYS-NH ₂ 212	148
6.31	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGNCRAEYS-NH ₂ 213	150
6.32	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGNCRAEYS-NH ₂ 214	150
6.33	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGGNCRAEYS-NH ₂ 215	150
6.34	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-PCRAEYS-NH ₂ 216	152
6.35	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-APCRAEYS-NH ₂ 217	152
6.36	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGPCRAEYS-NH ₂ 218	152
6.37	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGPCRAEYS-NH ₂ 219	154
6.38	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGPCRAEYS-NH ₂ 220	154
6.39	Ligation H-LYRAG-SR 194 /H-AGGGGPCRAEYS-NH ₂ 221	154
6.40	Ligationen 194/2 äq. 216 und 194/2 äq. 217	156
6.41	Ligationen 194/2 äq. 218 und 194/2 äq. 219	156
6.42	Ligationen 194/2 äq. 220 und 194/2 äq. 221	156

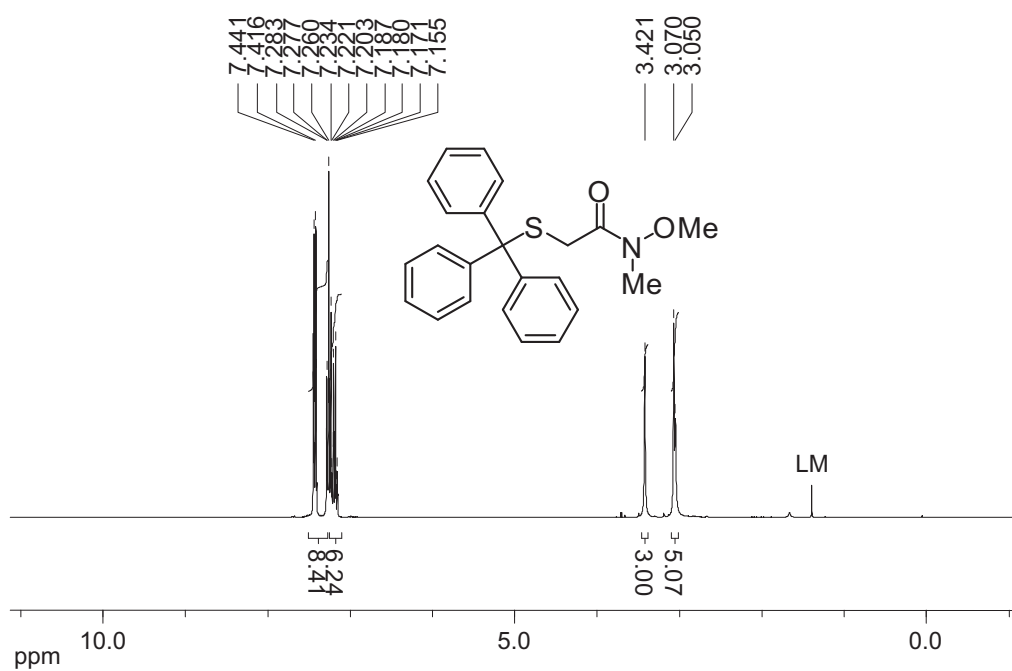
Tabellenverzeichnis

2.1	Thioesterreaktivität	7
2.2	Auxiliarsysteme	14
4.1	NMR-Daten isomerer <i>S</i> -Trt-Mercaptobutennitrile	37
4.2	NMR-Daten isomerer <i>S</i> -PMB-Mercaptobutennitrile	38
4.3	Ausbeuten der Penicillaminkupplungen und Entschwefelungen . .	71
6.2	Analyt. Daten Peptide Auxiliarligation	120
6.3	Reaktionskomponenten der auxiliar-vermittelten Ligation	121
6.4	Reaktionskomponenten der auxiliar-vermittelten Ligation	122
6.5	Analytische Daten der Thioesterpeptide 140, 161, 164, 167, 168, 170, 140, 194, 224 und 225	124
6.6	Analytische Daten der Pencillaminpeptide 152, 154, 159, 160, 162, 163, 169, 172, 176 und 179	126
6.7	Zuord. Komp. Ligation mit Valin I	128
6.8	Zuord. Komp. Ligation mit Valin II	131
6.9	Zuord. Komp. metall-basierte/-freie Entschwefelung	134
6.10	Analytische Daten der Peptide 195 - 209	136
6.11	Analytische Daten der Peptide 210 - 223	137
6.12	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein I	139
6.13	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein II	141
6.14	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein III	143
6.15	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein IV	145
6.16	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein V	147
6.17	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein VI	149
6.18	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein VII	151
6.19	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein VIII	153
6.20	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein IX	155
6.21	Zuord. Komp. Ligation mit internem Cystein X	157

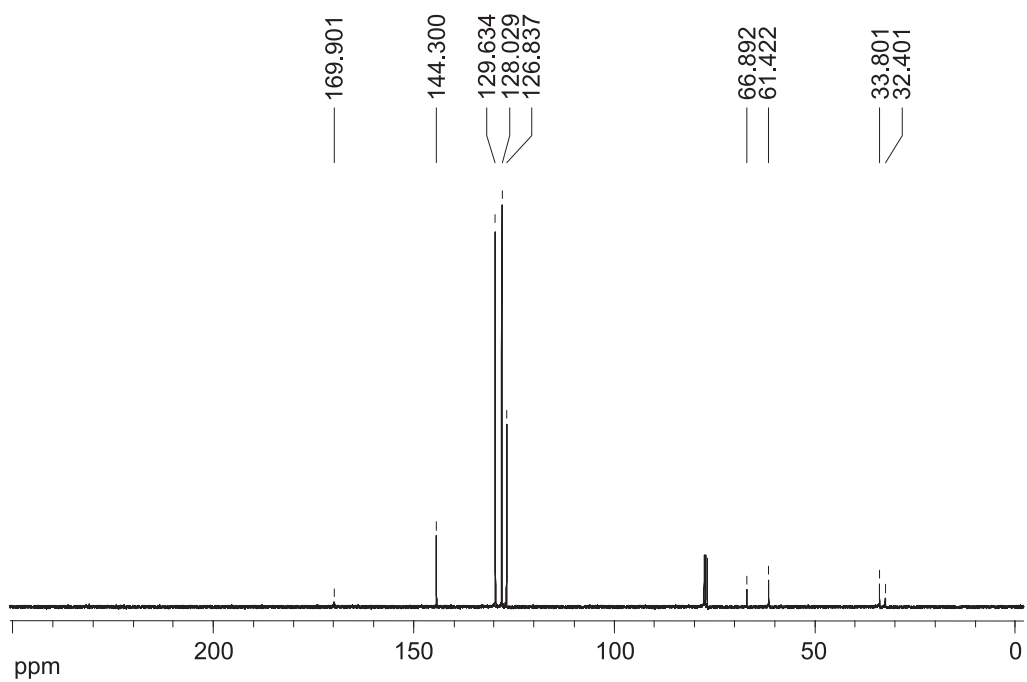
Spektrenanhang

1 Kernresonanzspektren

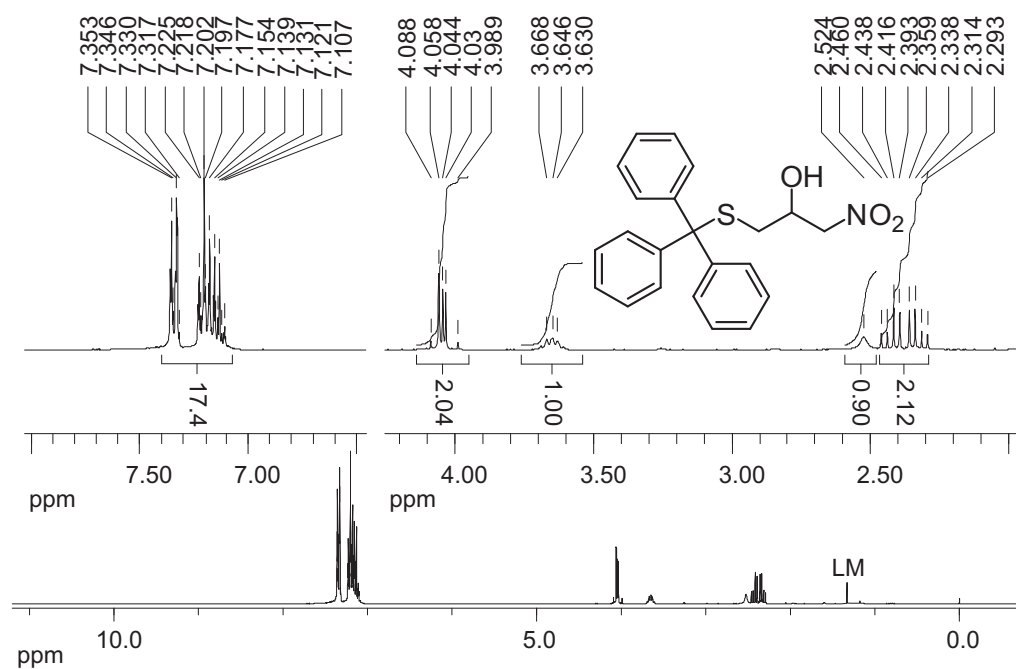
¹H-NMR-Spektrum von **76**



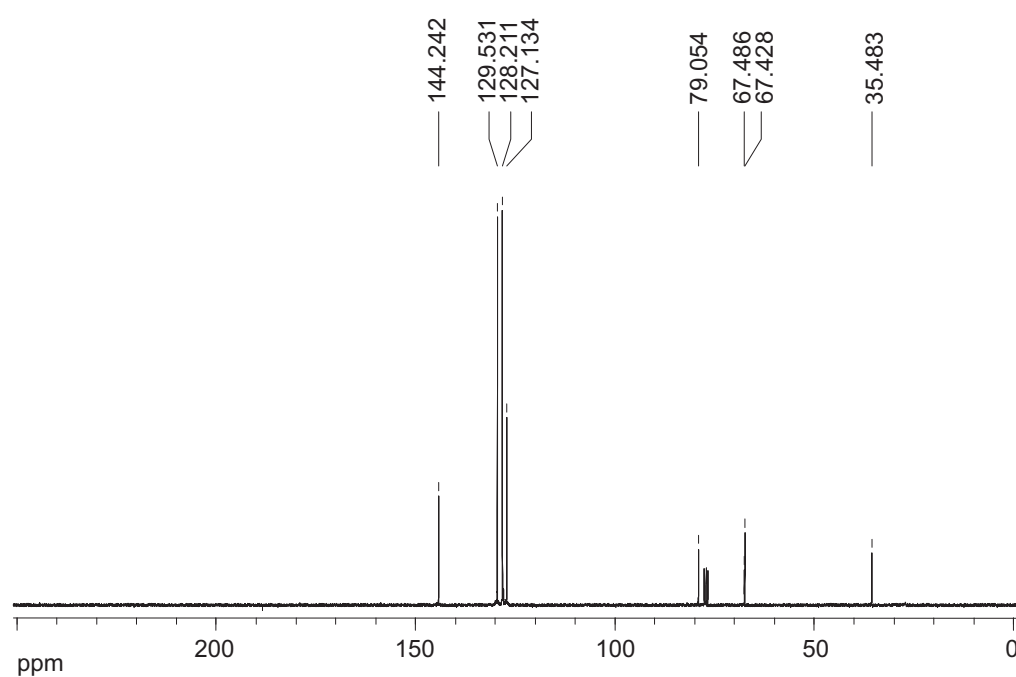
¹³C-NMR-Spektrum von **76**



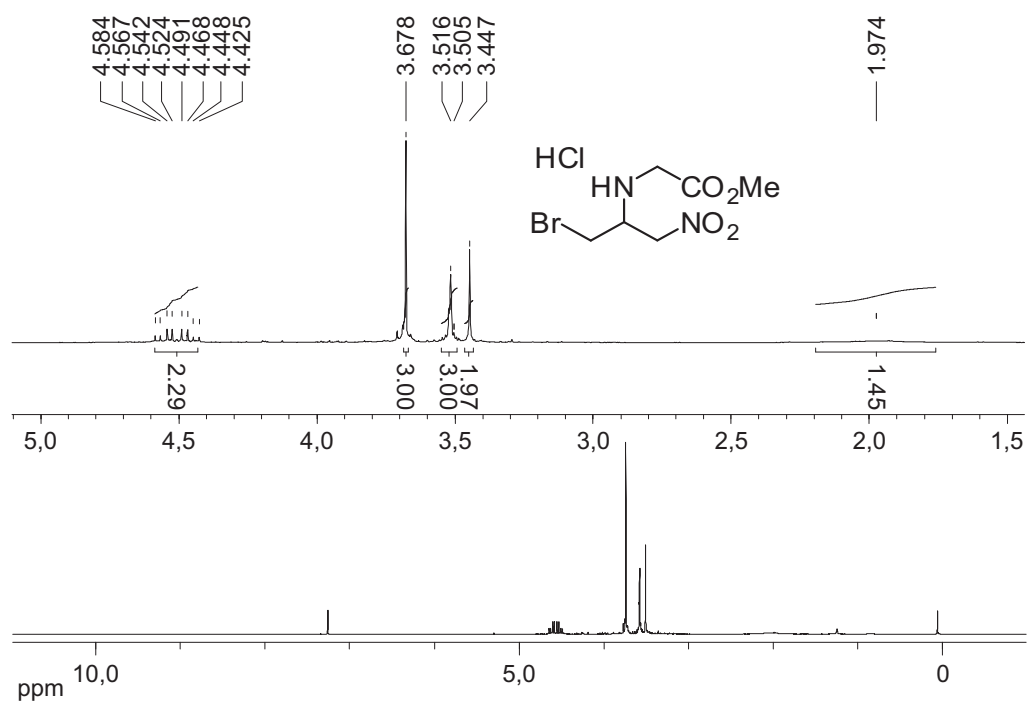
^1H -NMR-Spektrum von **78**



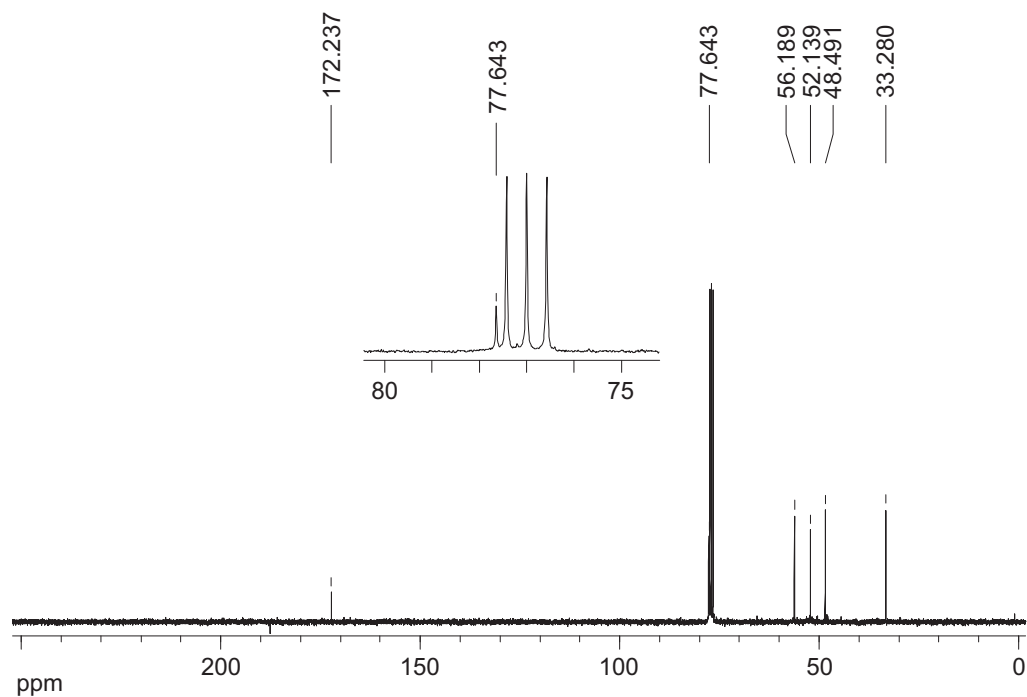
^{13}C -NMR-Spektrum von **78**



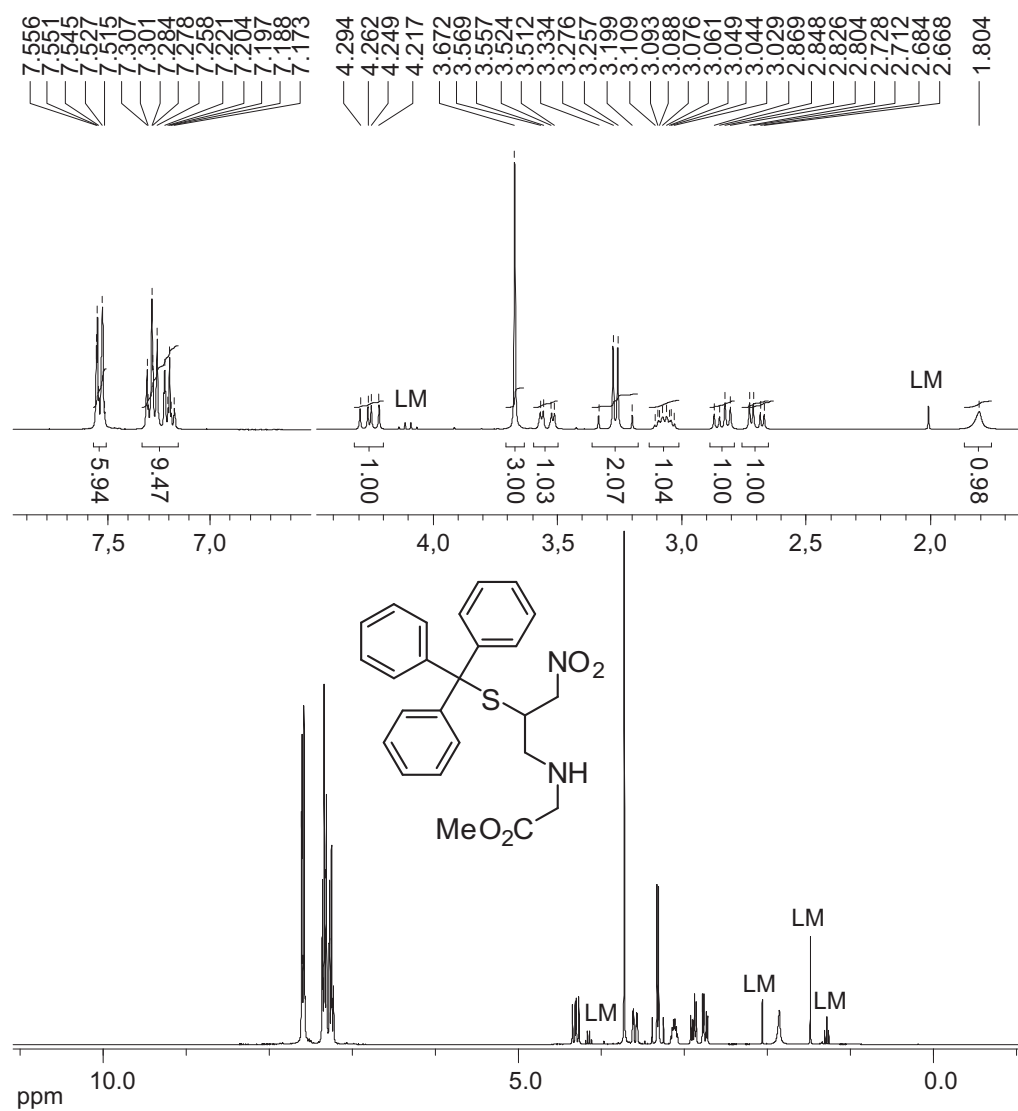
^1H -NMR-Spektrum von **82**



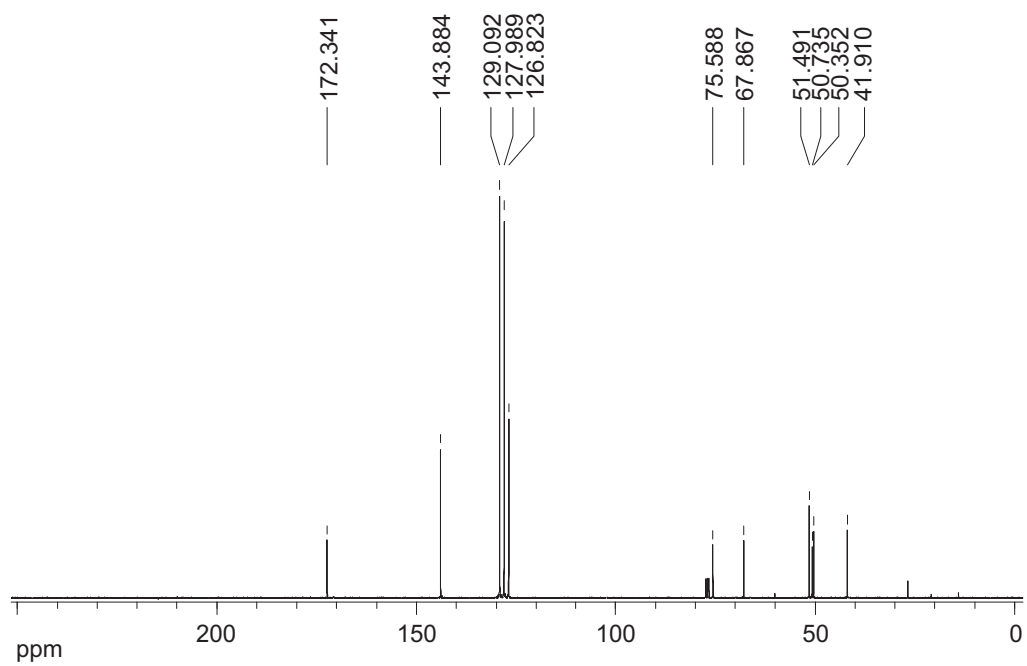
^{13}C -NMR-Spektrum von **82**



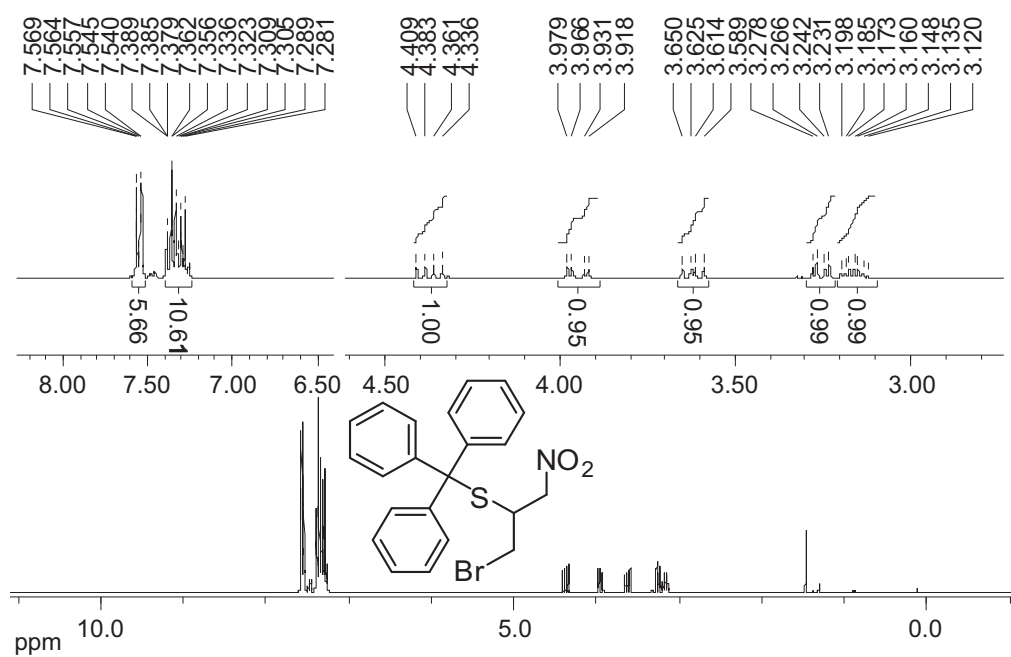
¹H-NMR-Spektrum von **84**



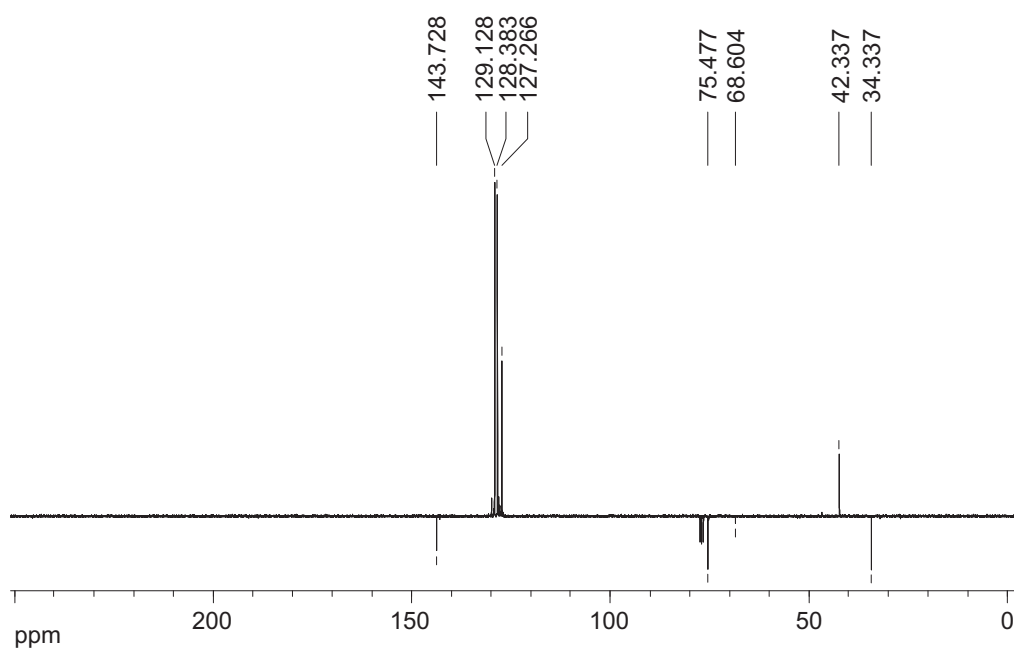
^{13}C -NMR-Spektrum von **84**



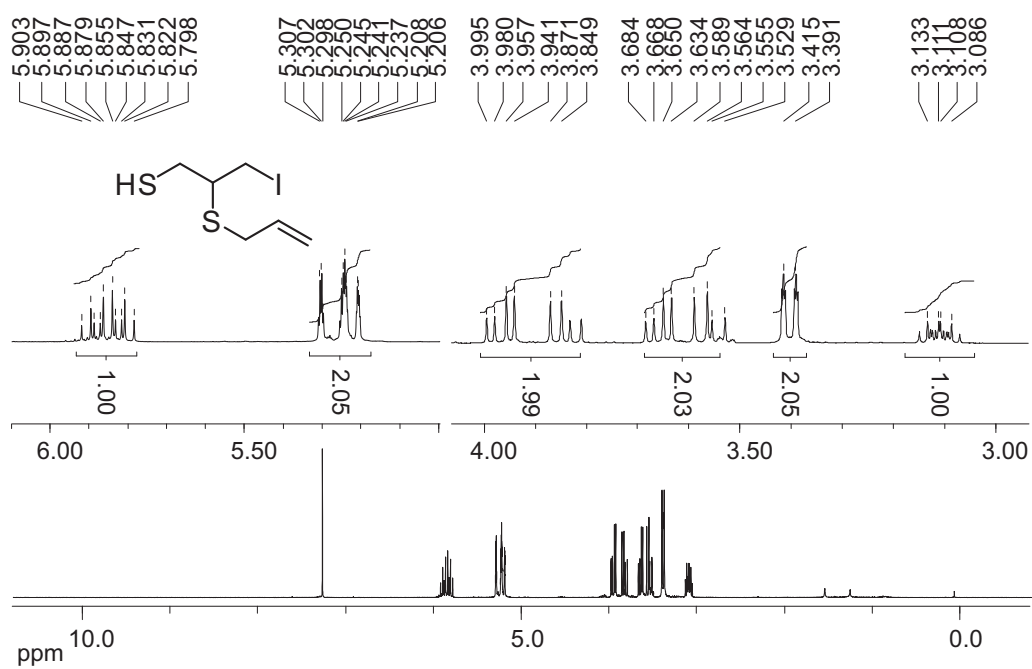
^1H -NMR-Spektrum von **90**



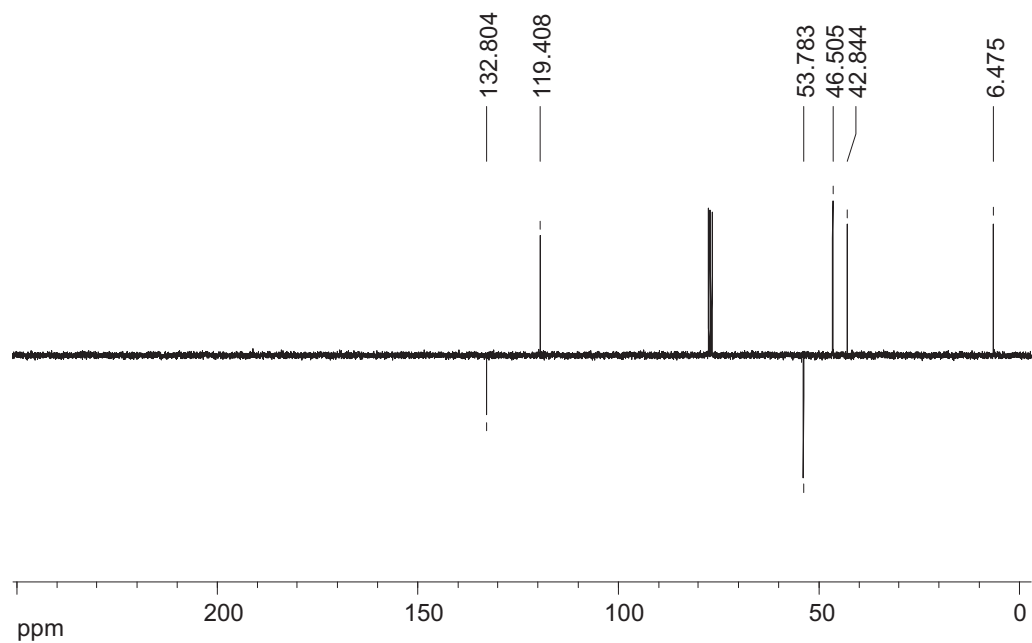
APT-NMR-Spektrum von **90**



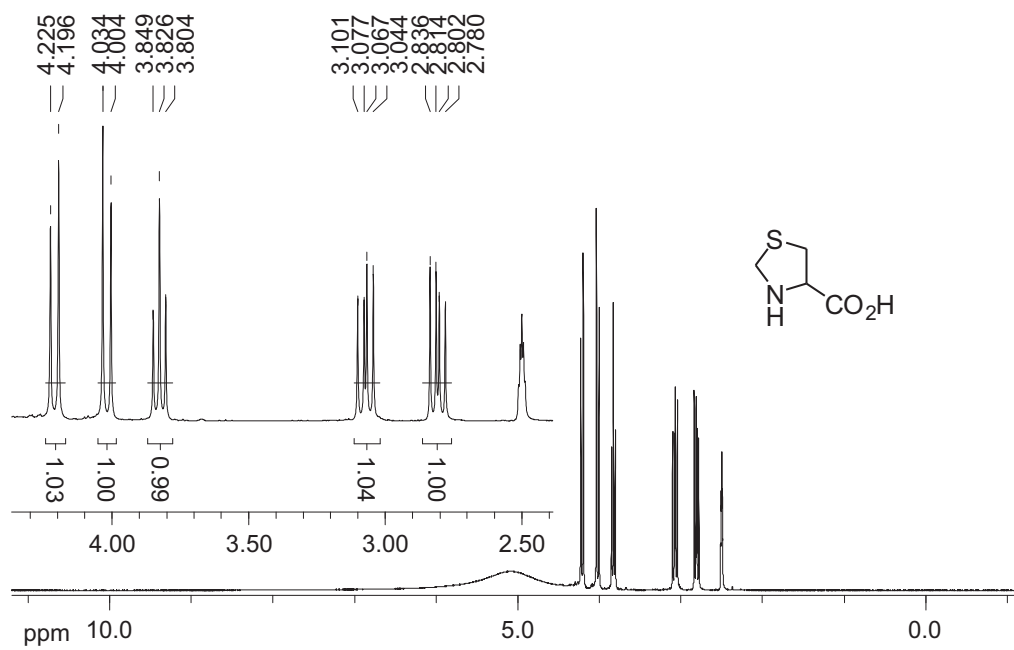
¹H-NMR-Spektrum von **99**



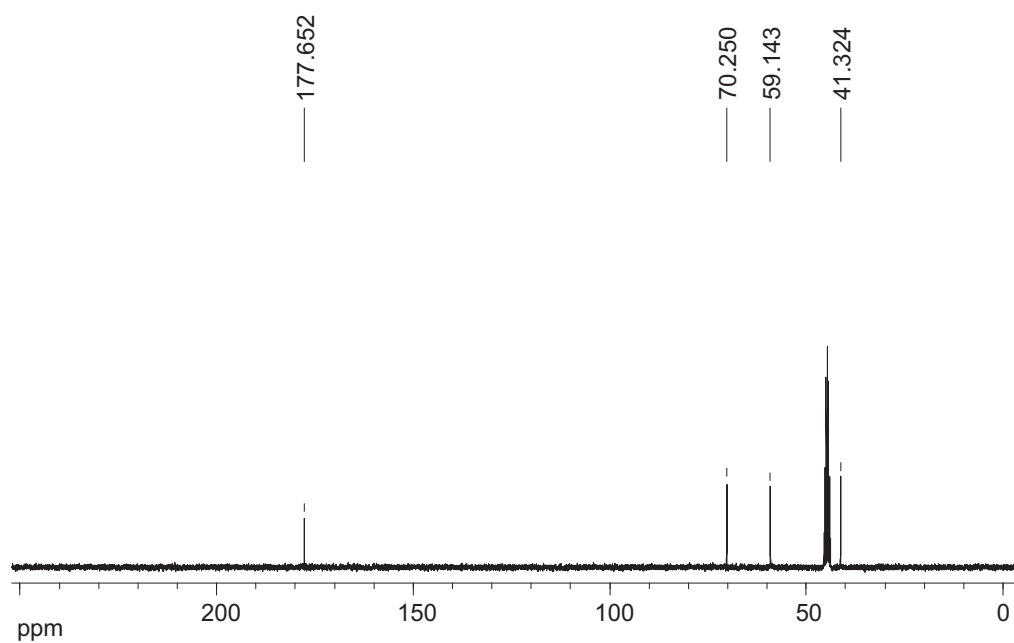
APT-NMR-Spektrum von **99**



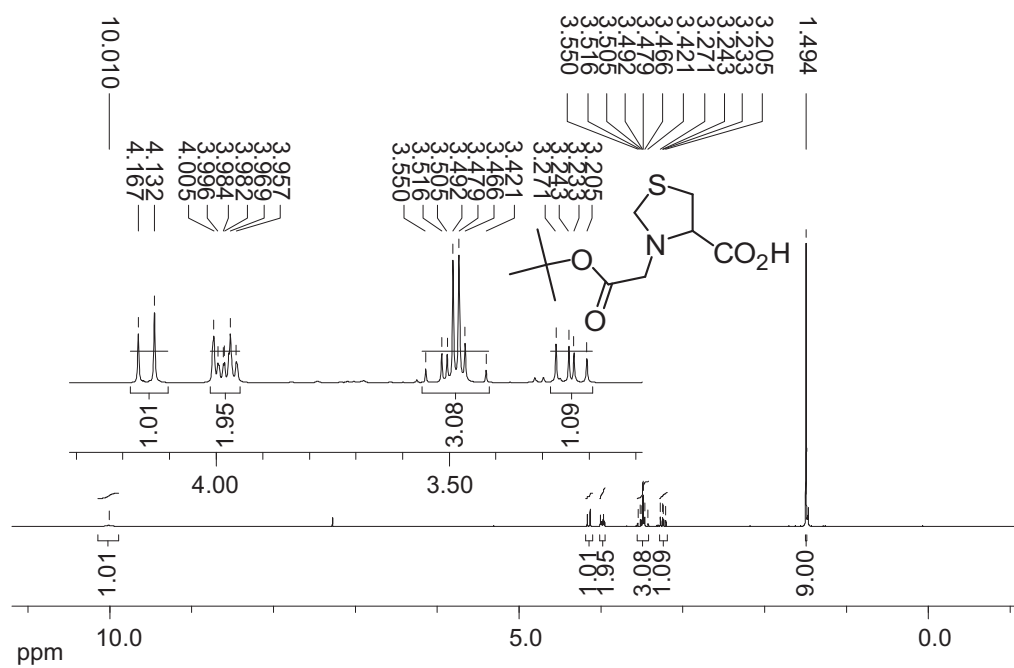
^1H -NMR-Spektrum von **100**



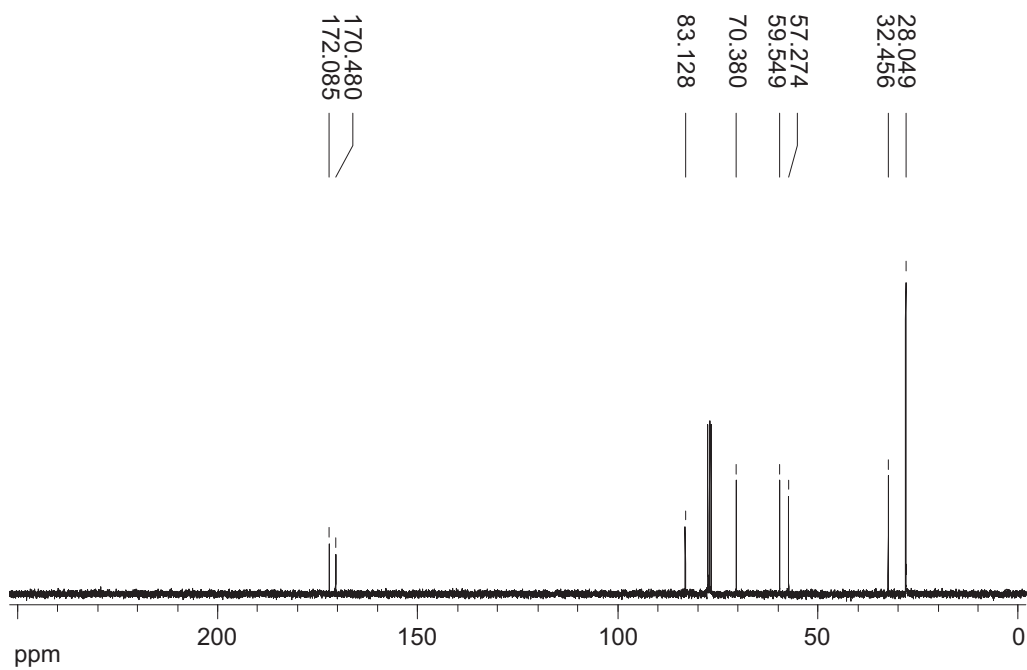
^{13}C -NMR-Spektrum von **100**



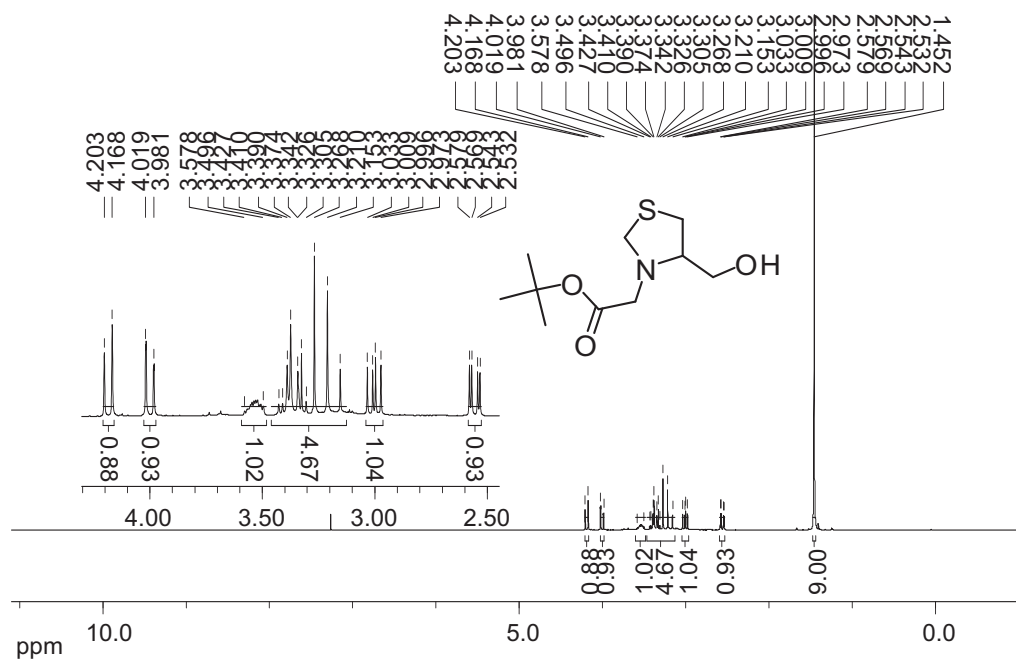
¹H-NMR-Spektrum von **101**



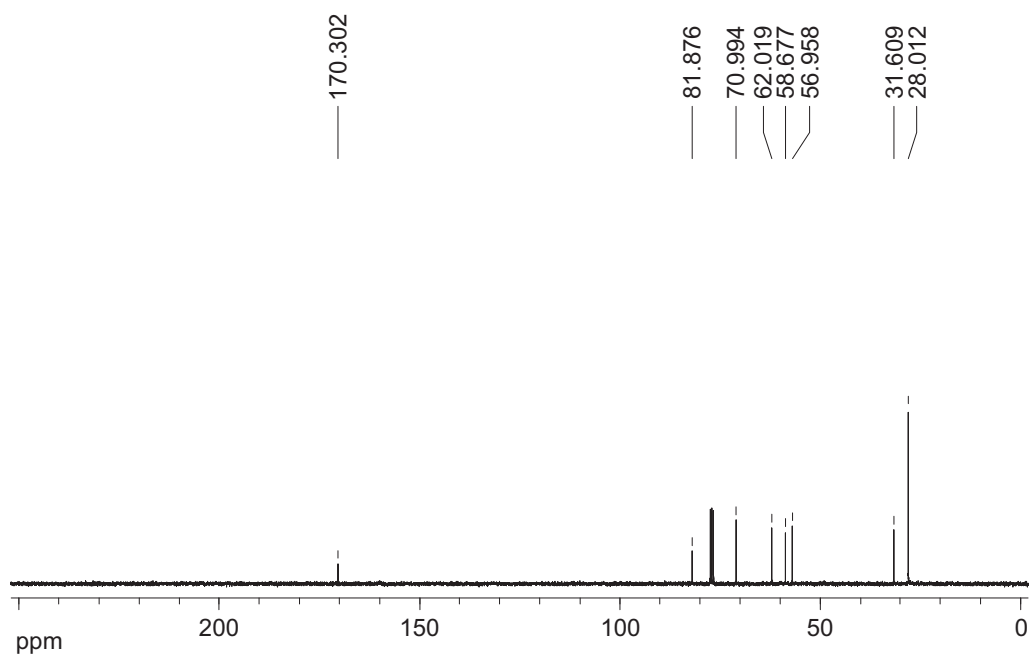
¹³C-NMR-Spektrum von **101**



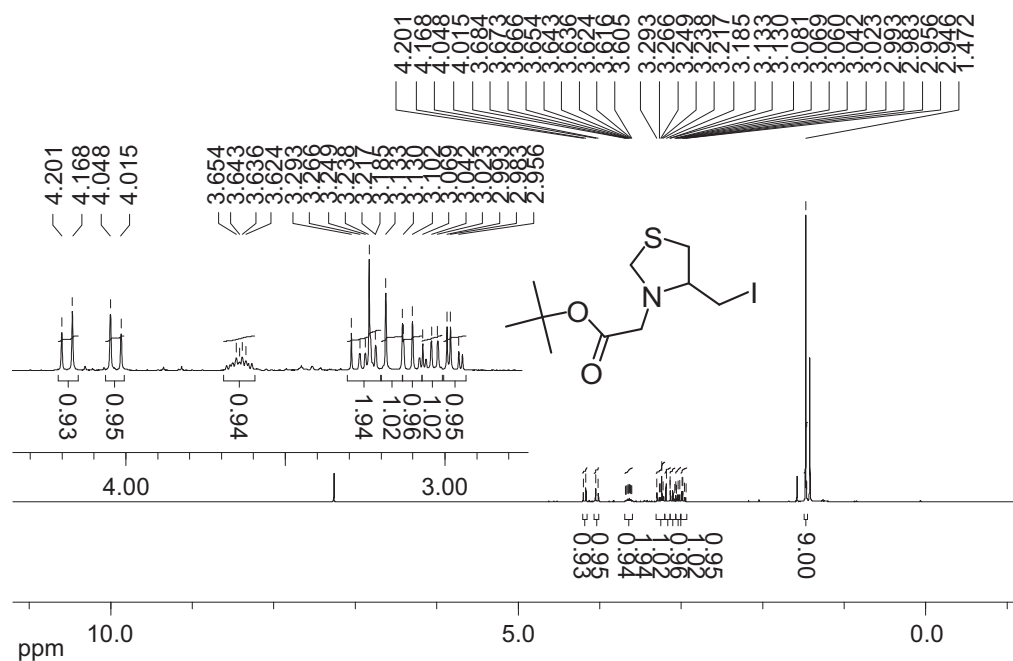
^1H -NMR-Spektrum von **102**



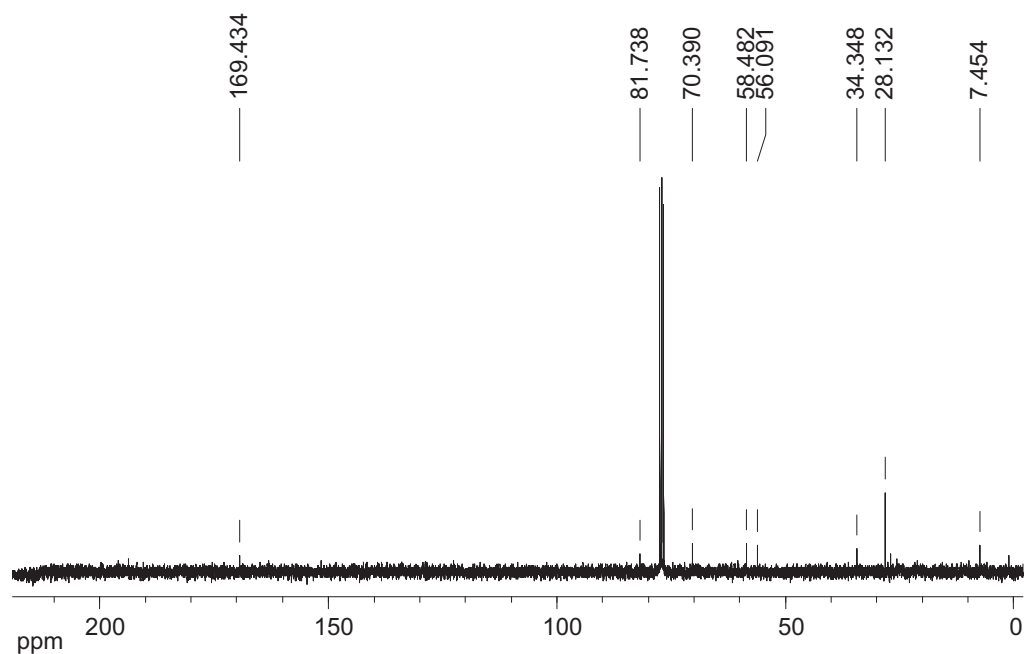
^{13}C -NMR-Spektrum von **102**



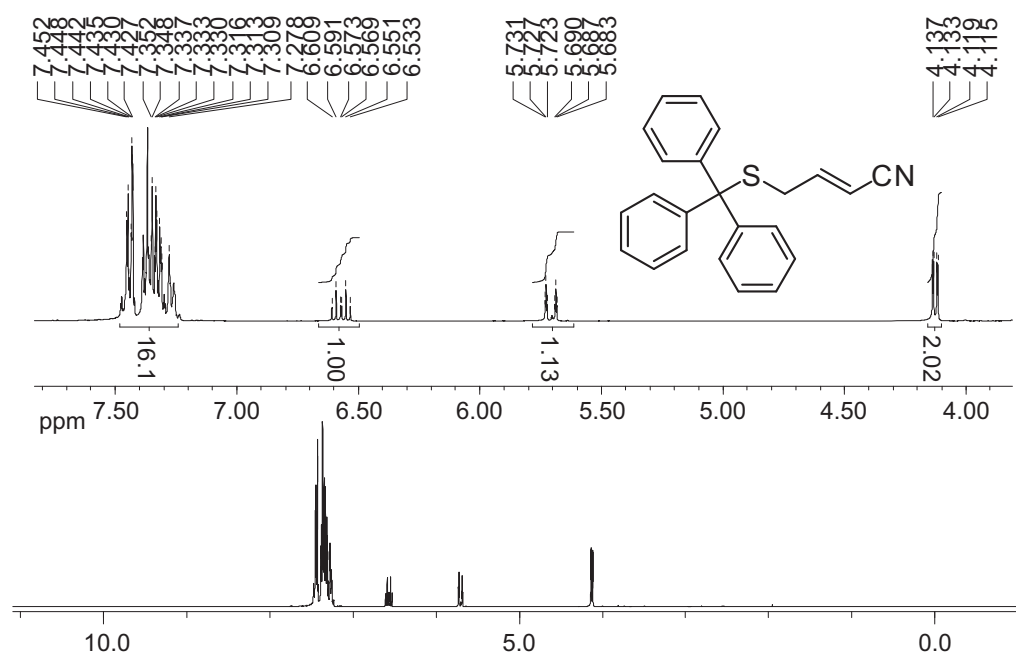
^1H -NMR-Spektrum von **103**



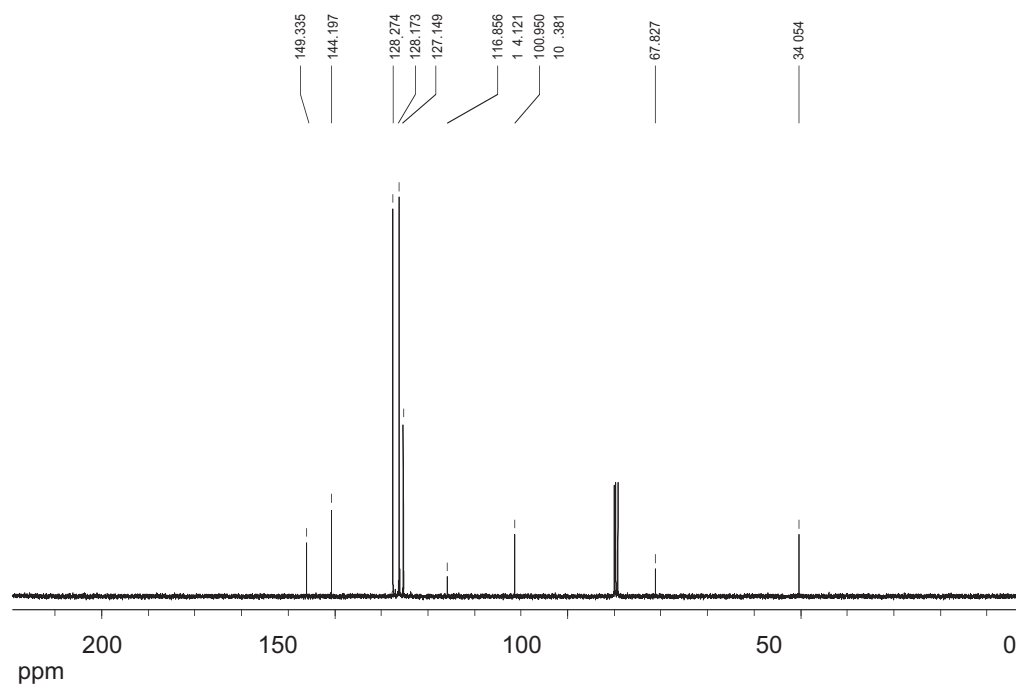
^{13}C -NMR-Spektrum von **103**



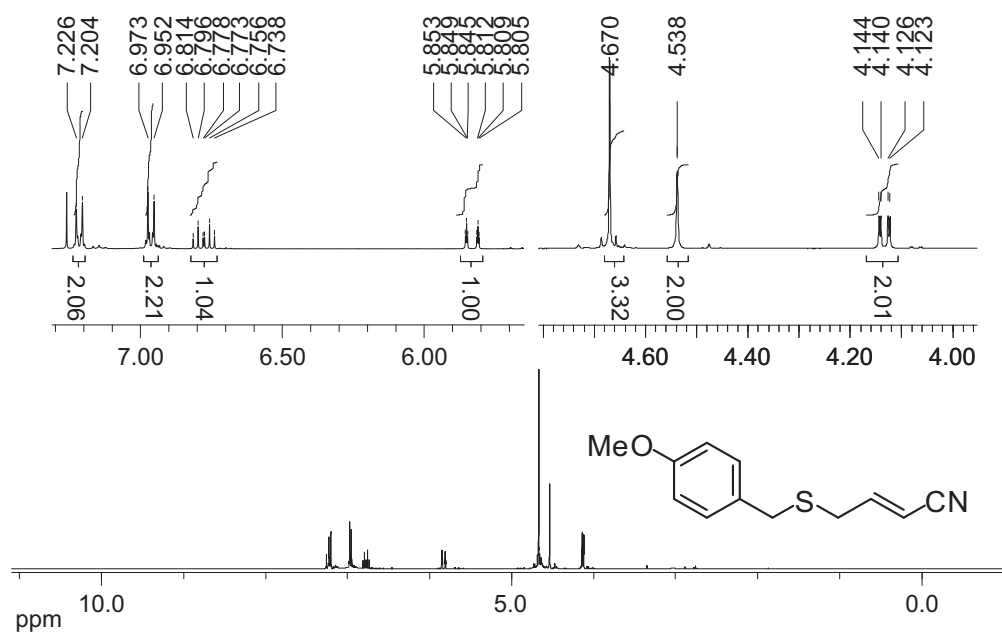
^1H -NMR-Spektrum von **113**



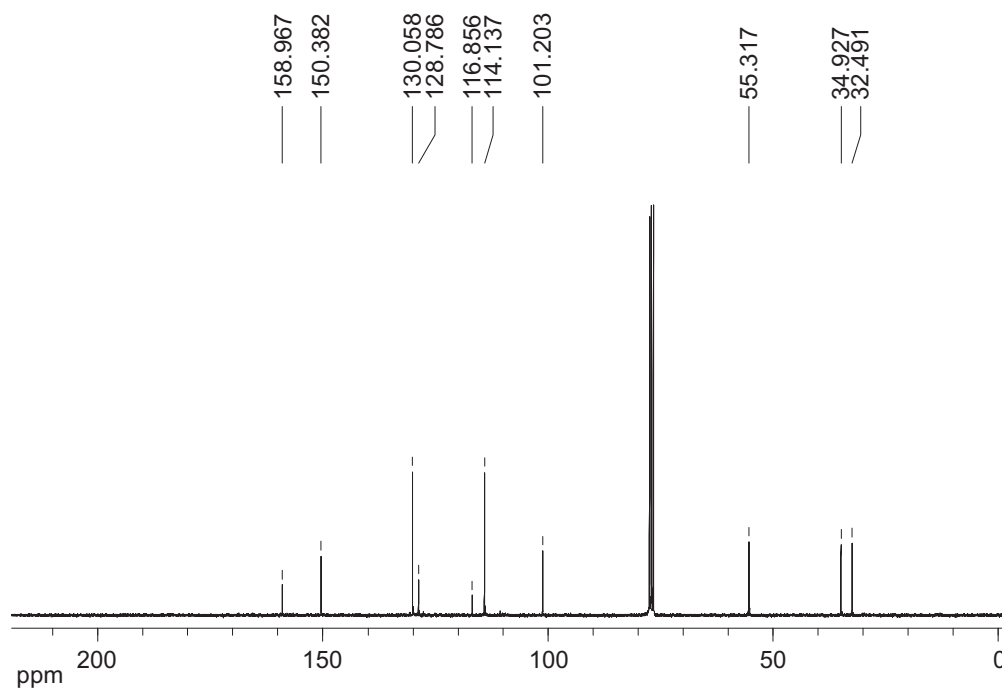
^{13}C -NMR-Spektrum von **113**

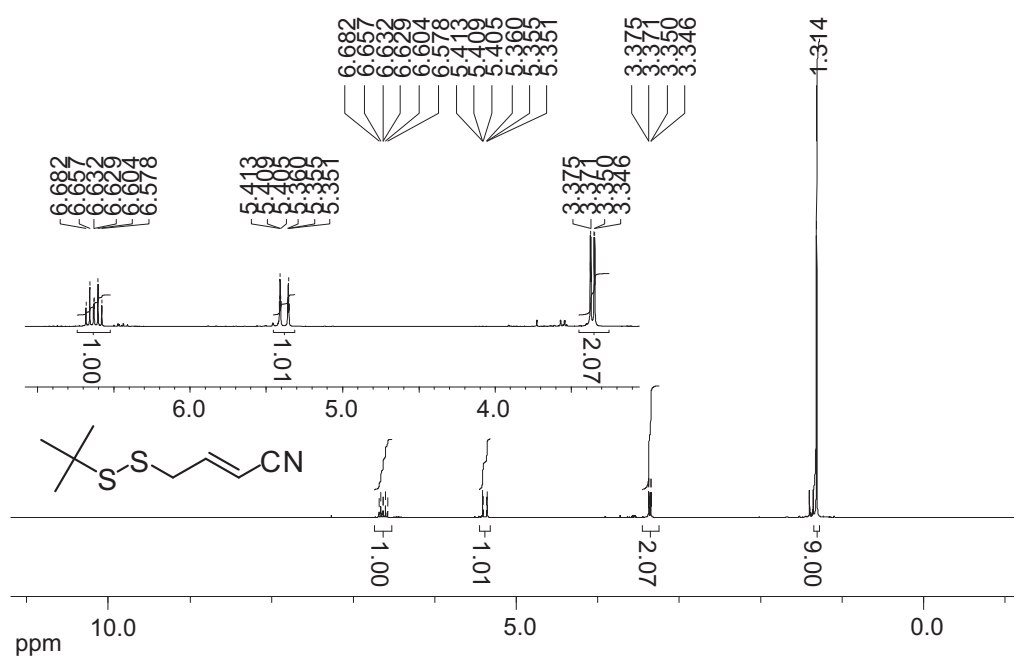
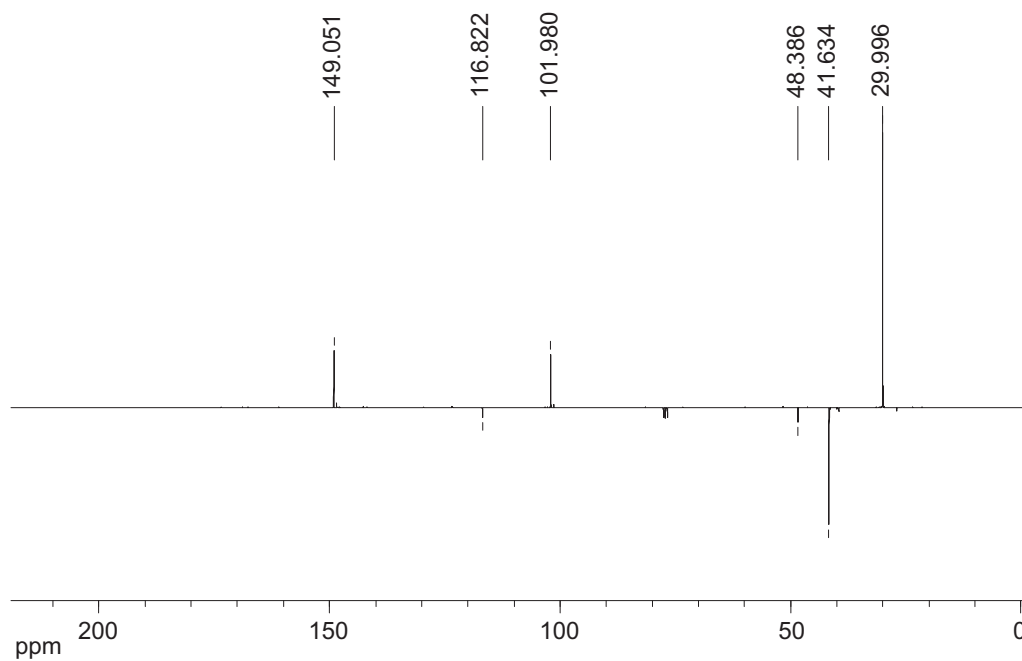


^1H -NMR-Spektrum von **114**

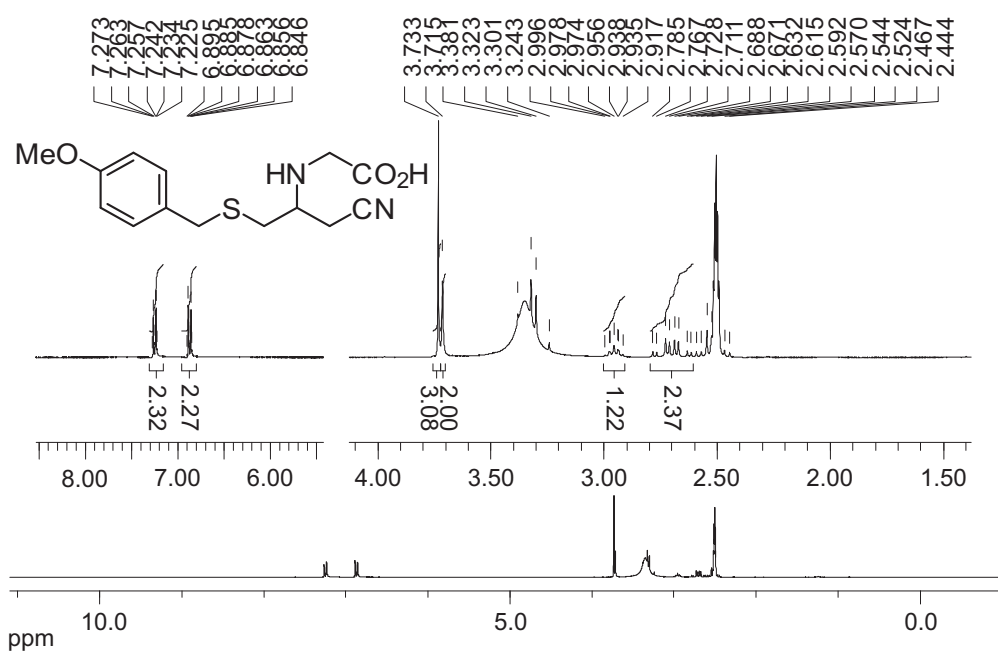


^{13}C -NMR-Spektrum von **114**

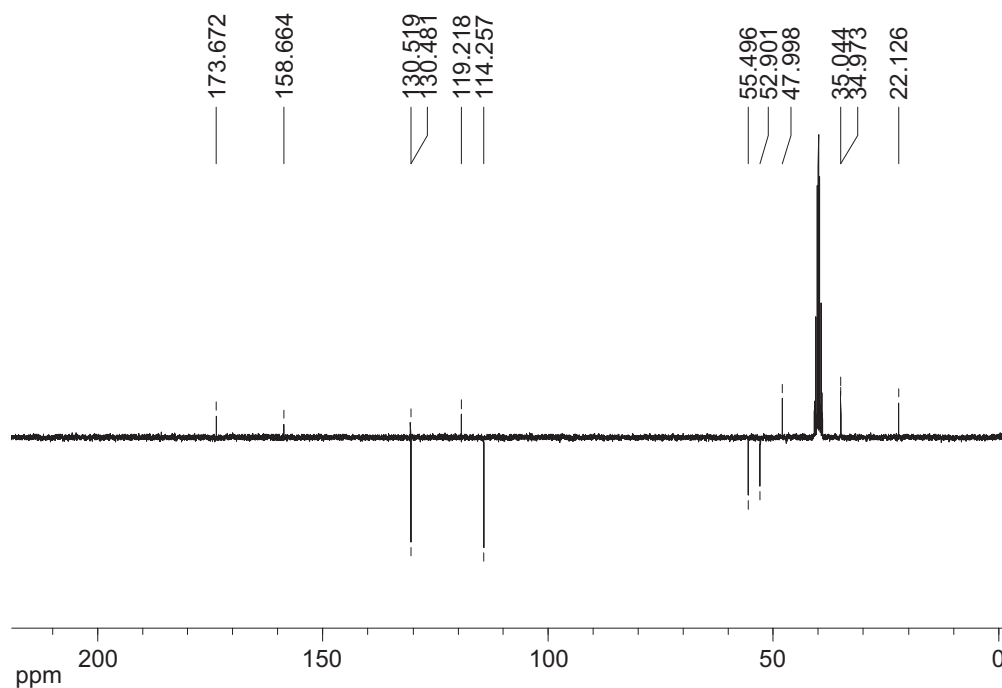


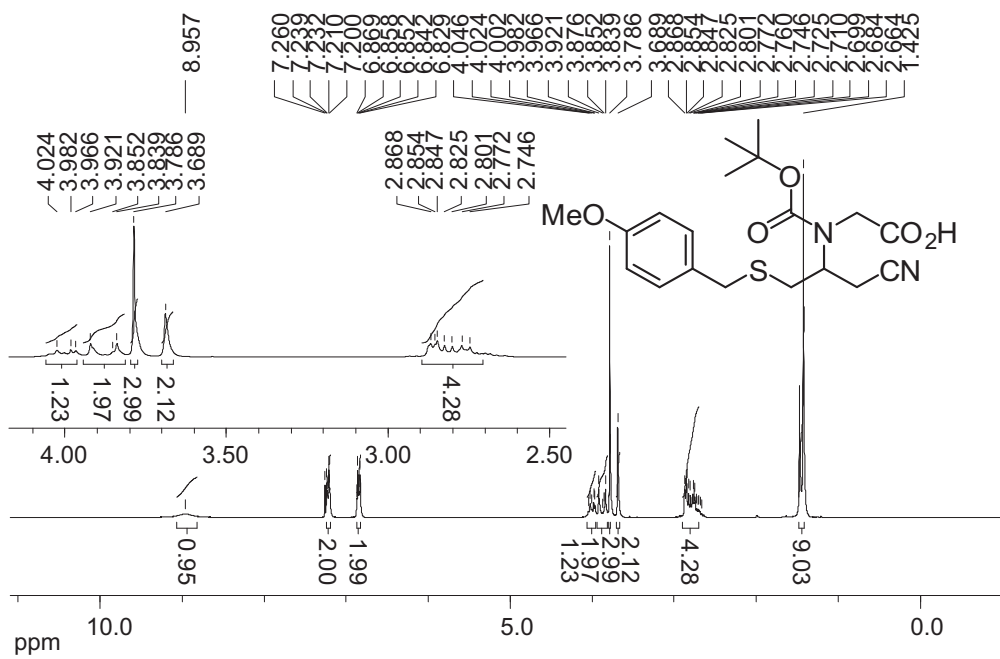
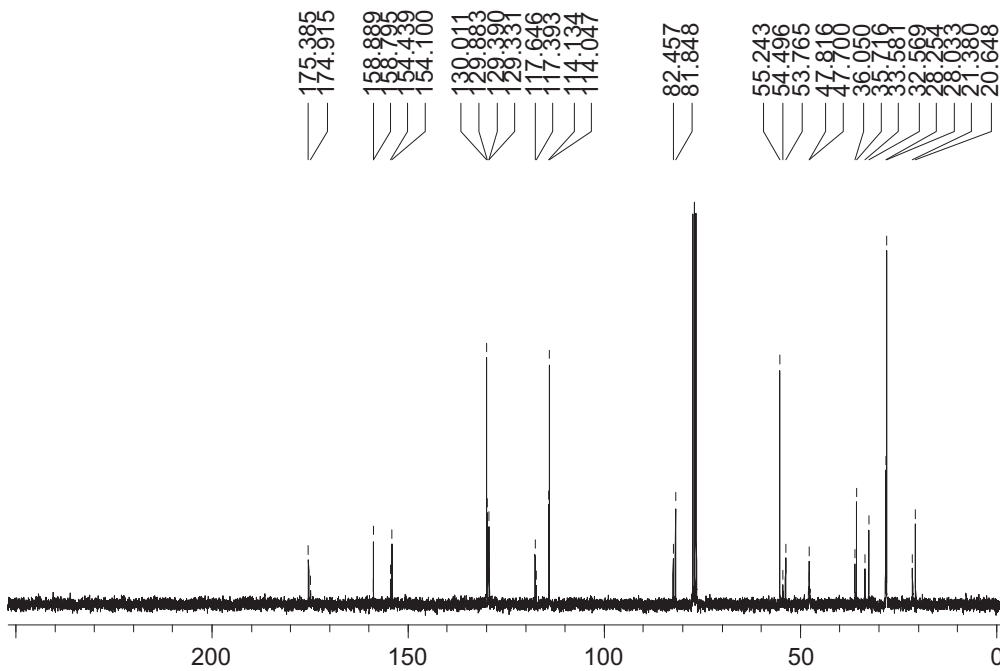
¹H-NMR-Spektrum von **115** ^{13}C -NMR-Spektrum von **115**

¹H-NMR-Spektrum von **117**

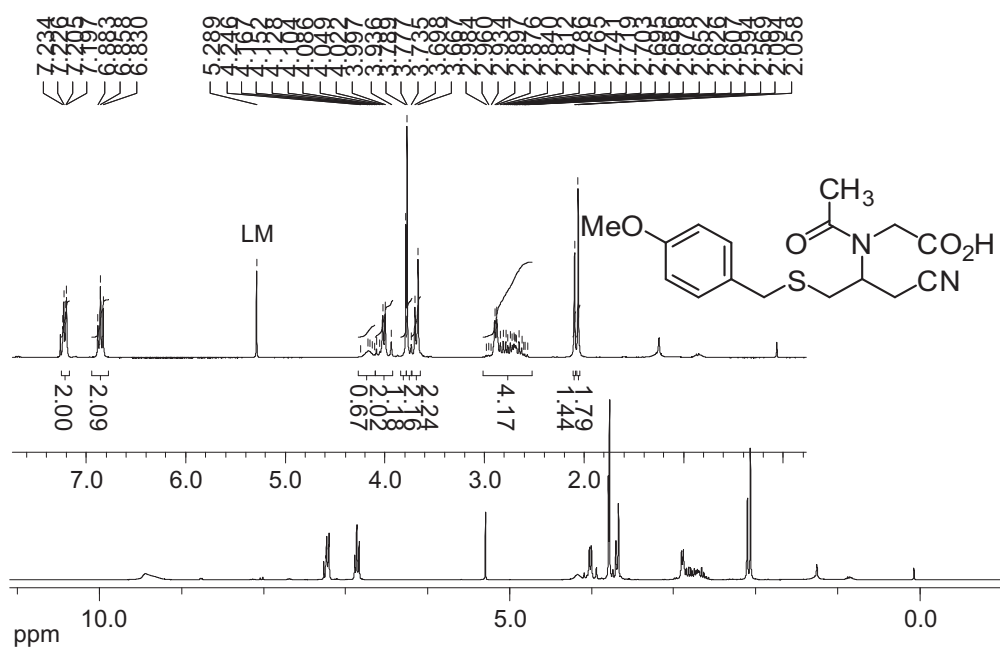


APT-NMR-Spektrum von **117**

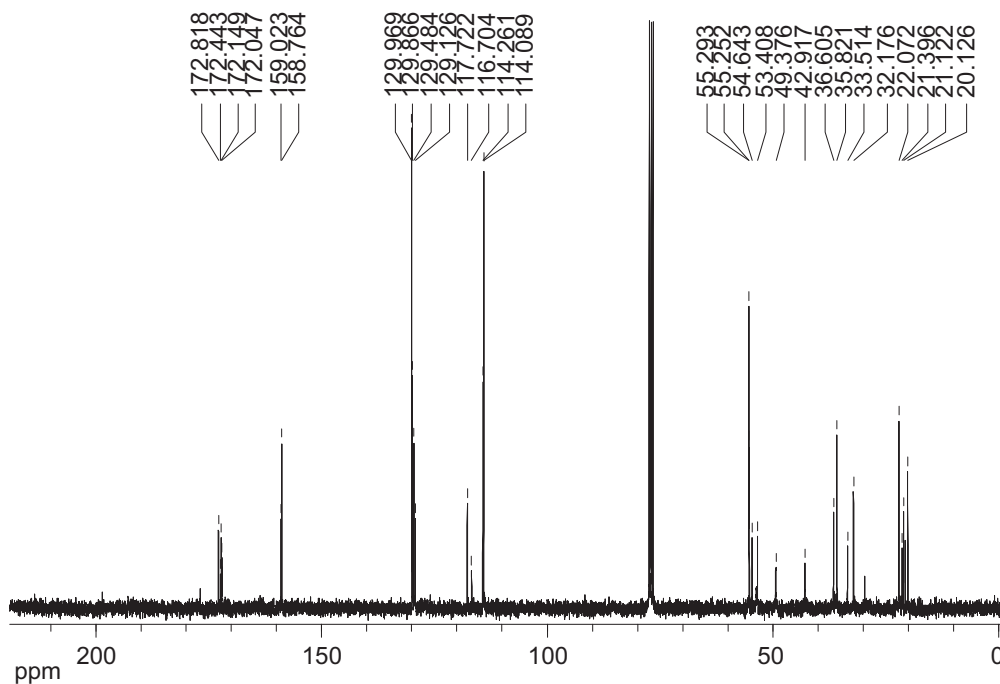


¹H-NMR-Spektrum von **118** ^{13}C -NMR-Spektrum von **118**

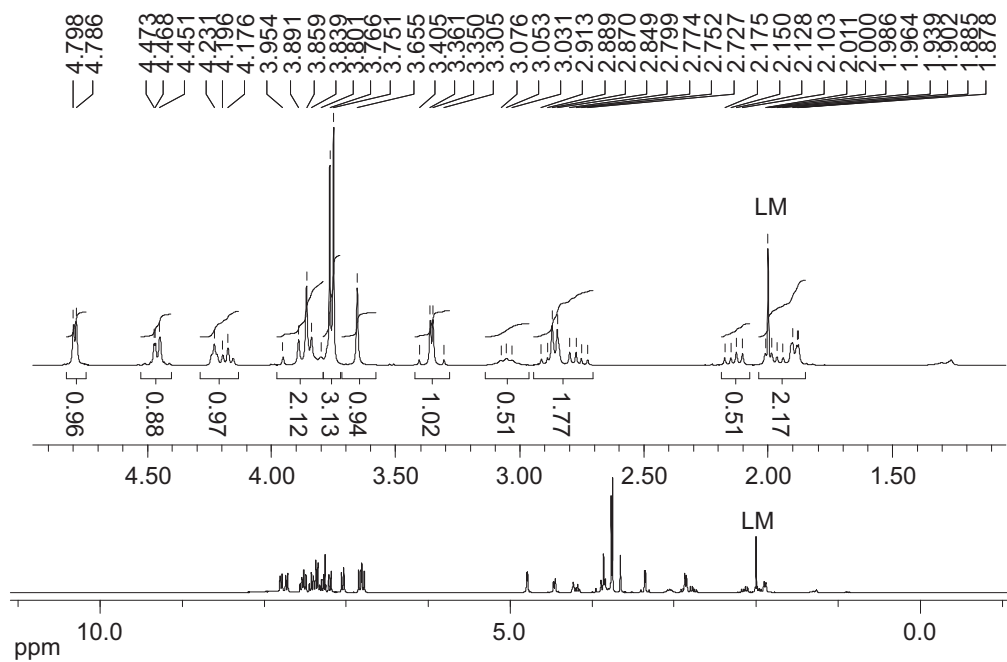
¹H-NMR-Spektrum von **119**



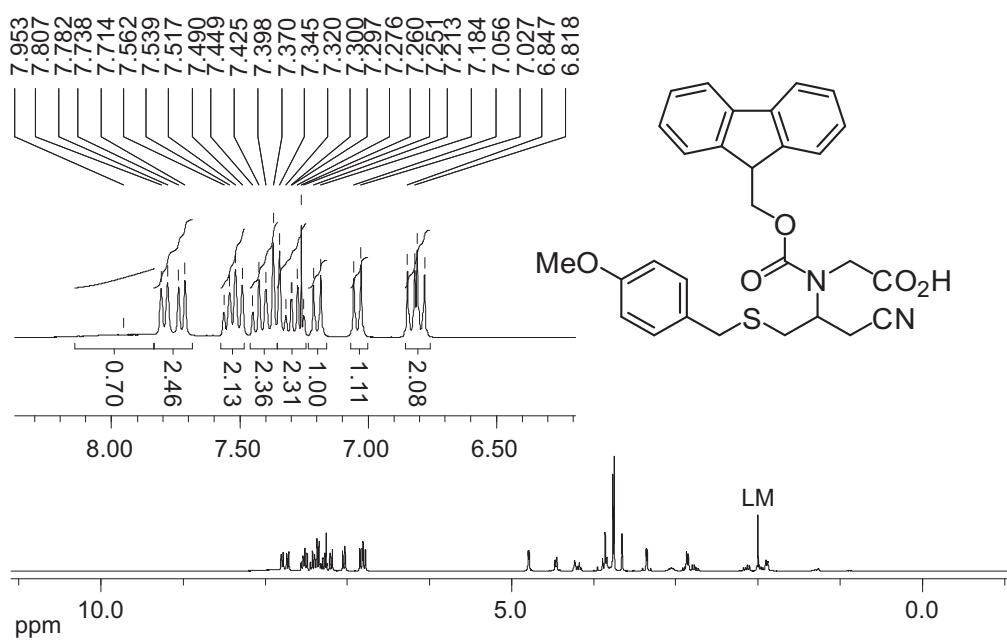
¹³C-NMR-Spektrum von **119**



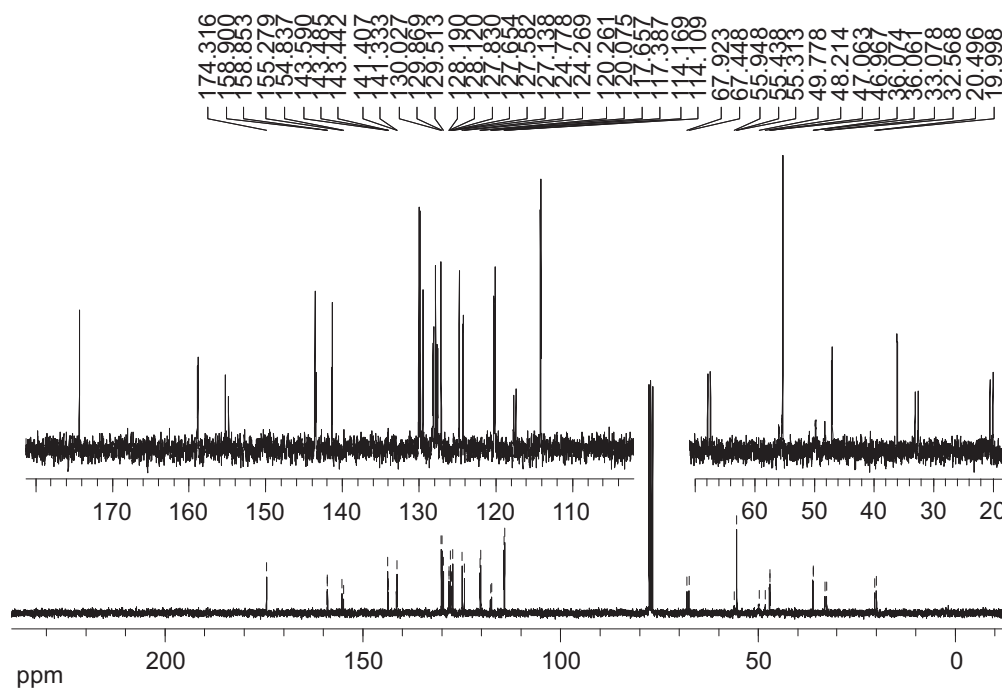
^1H -NMR-Spektrum von **120** (aliphatischer Bereich)



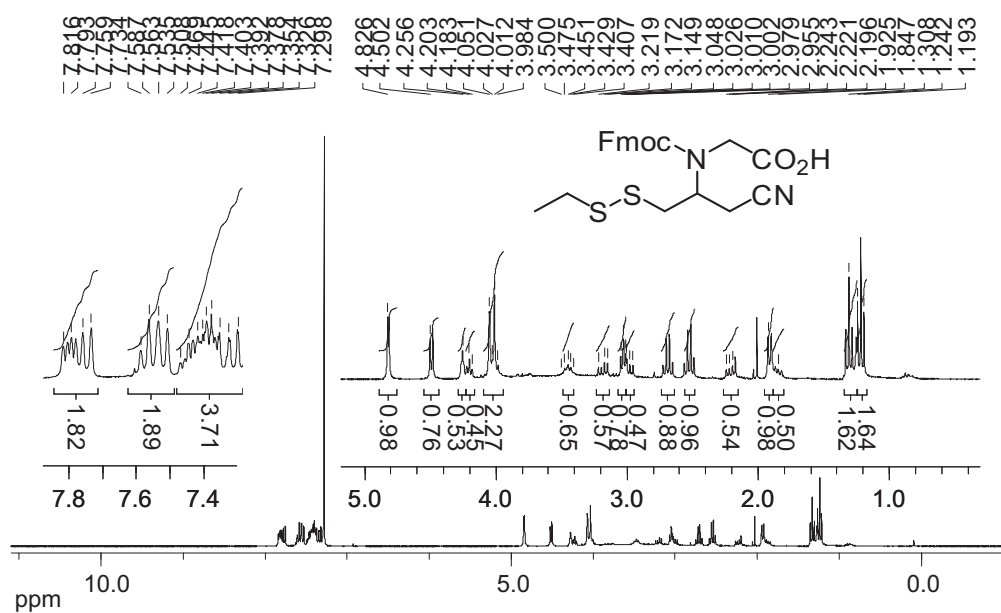
^1H -NMR-Spektrum von **120** (aromatischer Bereich)



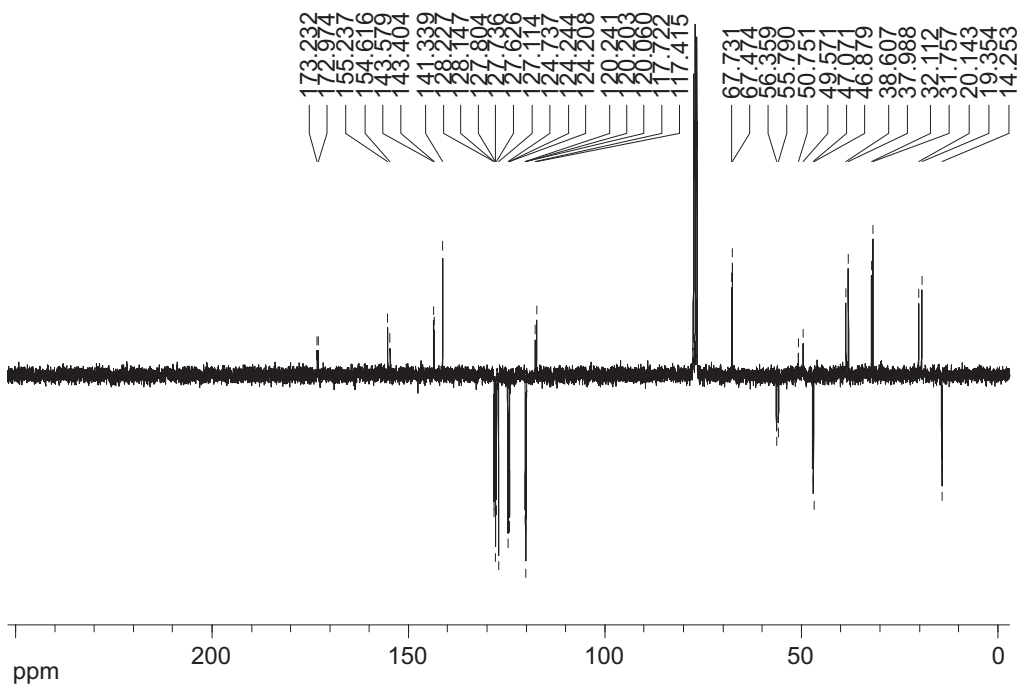
^{13}C -NMR-Spektrum von **120**



^1H -NMR-Spektrum von **121**



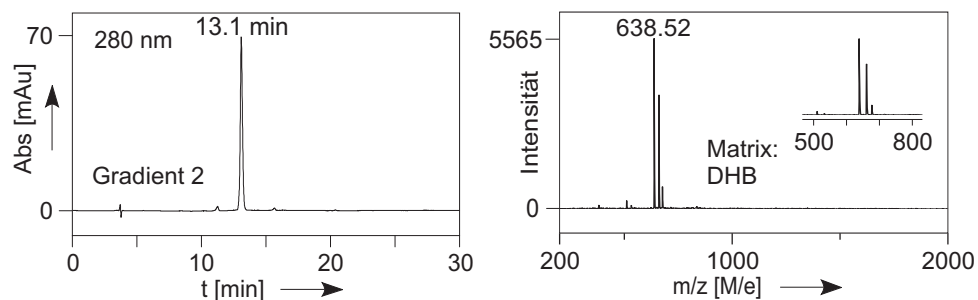
APT-NMR-Spektrum von **121**



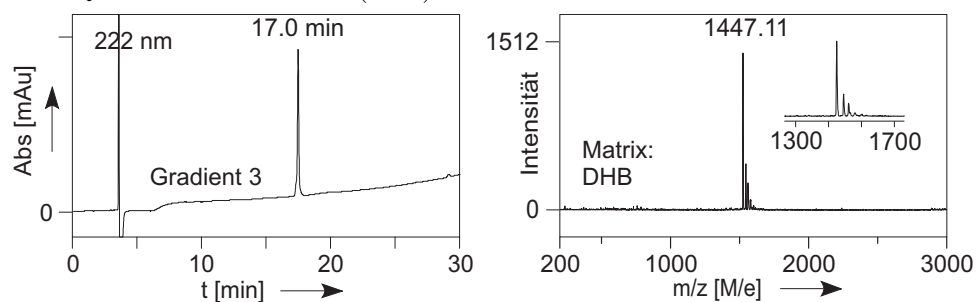
2 Chromatogramme und MALDI-TOF-MS Spektren von Peptiden

2.1 Peptidthioester

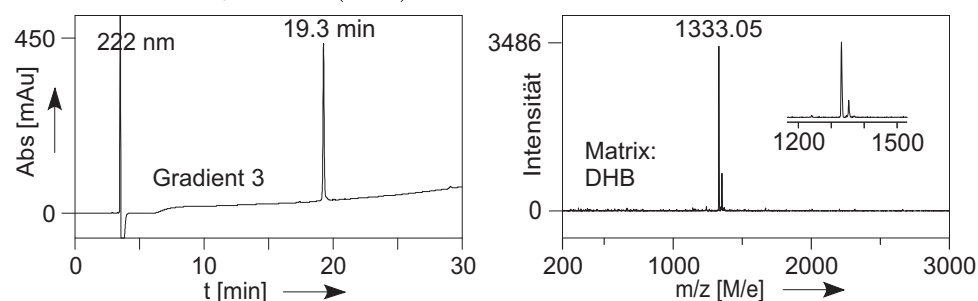
H-LYKAG-SCH₂CH₂CONH₂ (**140**)



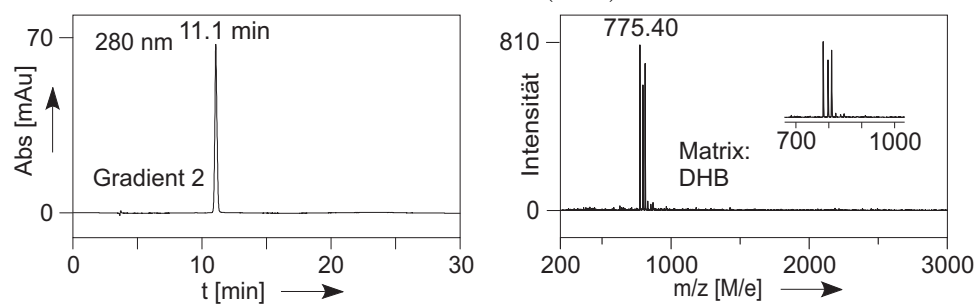
Ac-TLQNREHETNG-SBn (**161**)



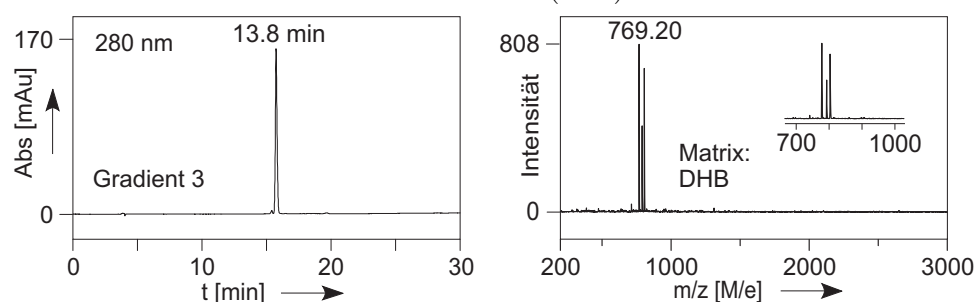
Ac-LKKPFNRPQG-SBn (**164**)



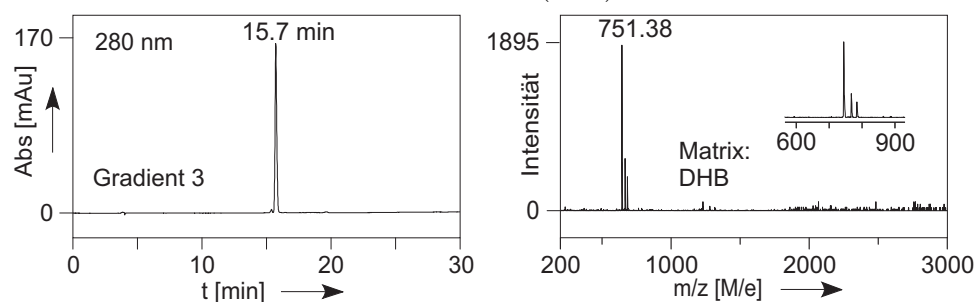
H-LYKAH-SCH₂CH₂CONHCH₂CONH₂ (**167**)



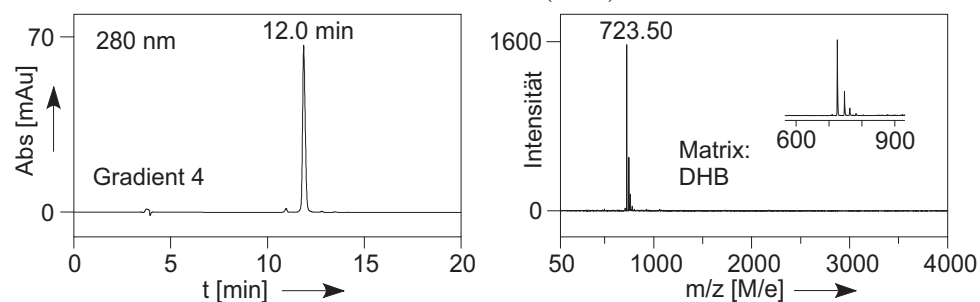
H-LYKAM-SCH₂CH₂CONHCH₂CONH₂ (**168**)



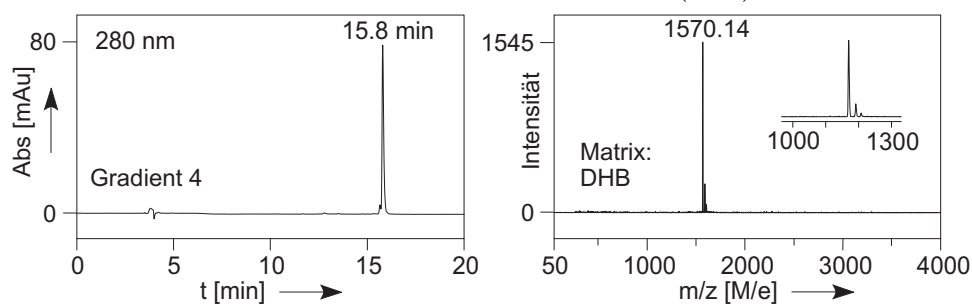
H-LYKAL-SCH₂CH₂CONHCH₂CONH₂ (**170**)



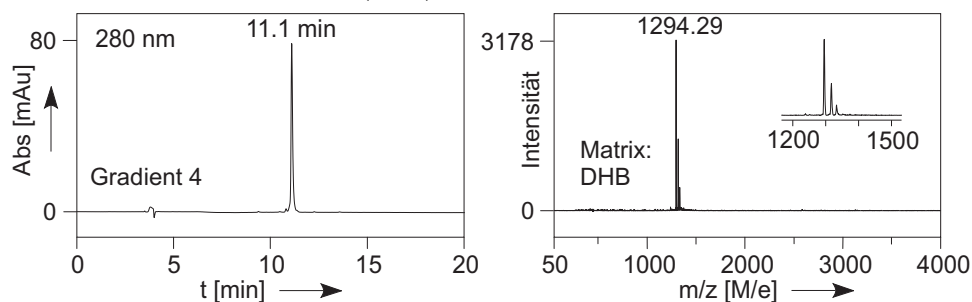
H-LYRAG-SCH₂CH₂CONHCH₂CONH₂ (**194**)



H-KFSYLPFIPTRG-SCH₂CH₂CONHCH₂CONH₂ (**224**)

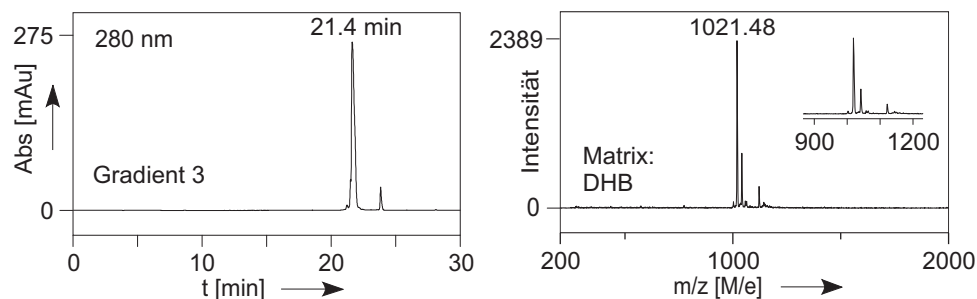


Ac-YQQTGRAGRDG-SEt (**225**)

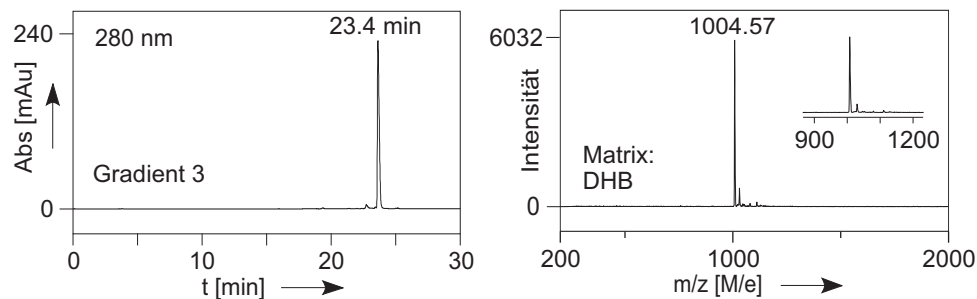


2.2 Peptide aus Kapitel 4.1: Cystein-freie Ligation mit Hilfe basenlabiler Auxiliare

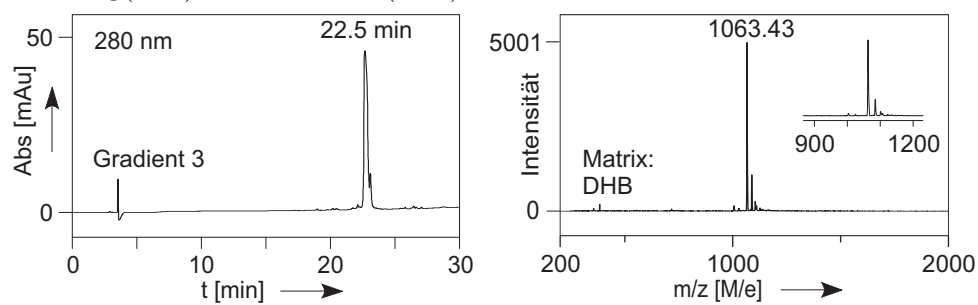
Fmoc-Aag-RAEYS-OH (**134**)



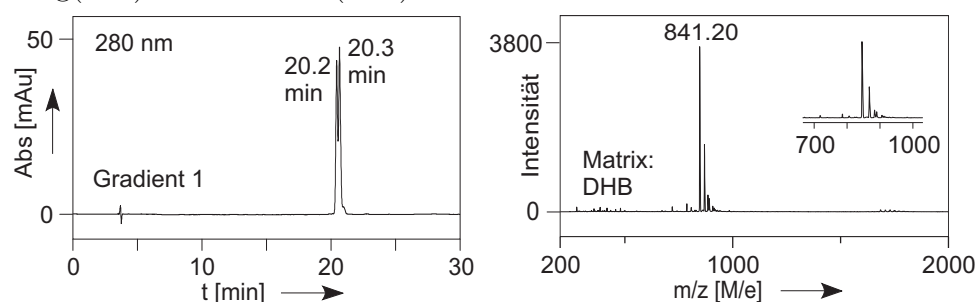
Fmoc-Tag-RAEYS-OH (**135**)



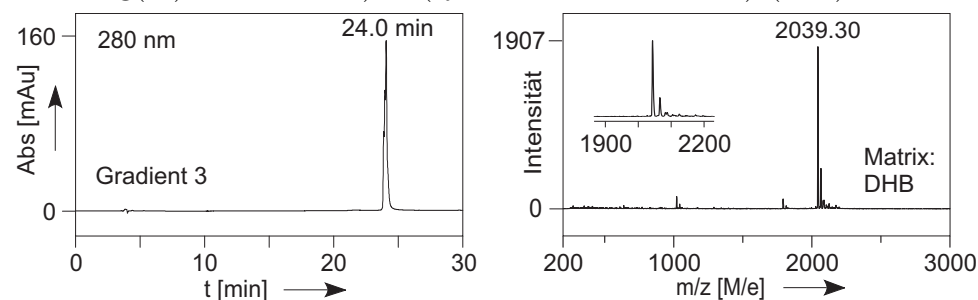
Fmoc-Nag(SET)-RAEYS-OH (**136**)



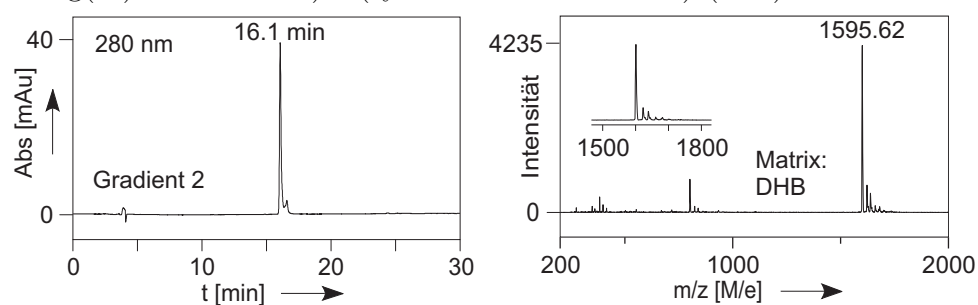
H-Nag(SET)-RAEYS-OH (**137**)



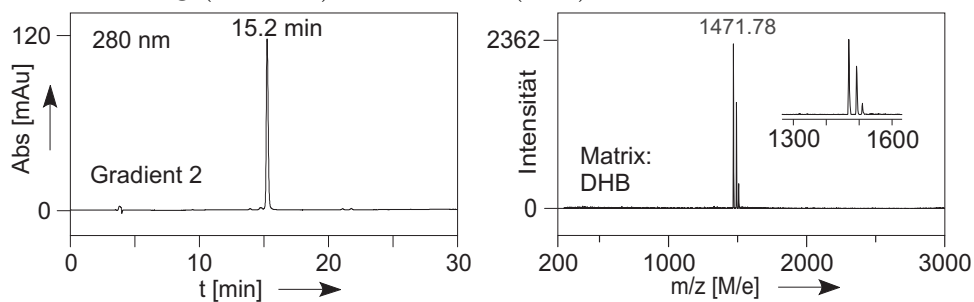
(Fmoc-Aag(S-)-RAEYS-OH)₂ - (symmetrisches Disulfid) (**142**)



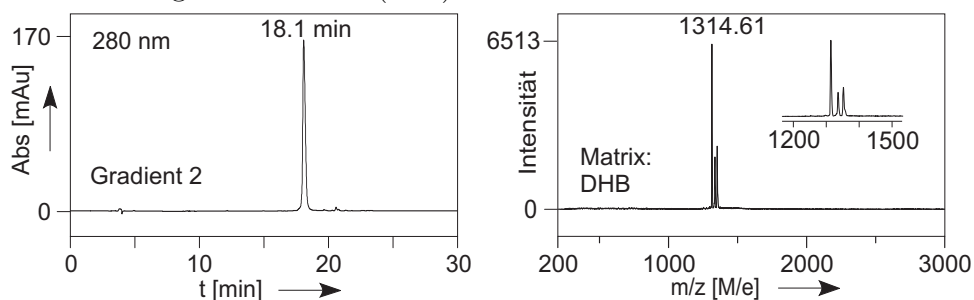
(H-Aag(S-)-RAEYS-OH) - (symmetrisches Disulfid) (**143**)



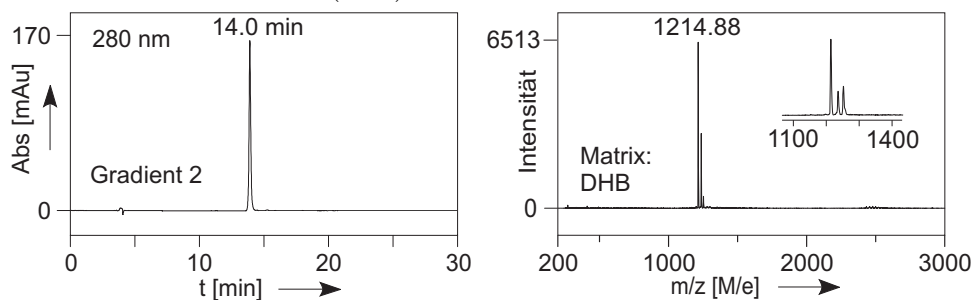
H-LYKAG-Aag-(SMESA)RAEYS-OH (147)



H-LYKAG-Tag-RAEYS-OH (148)

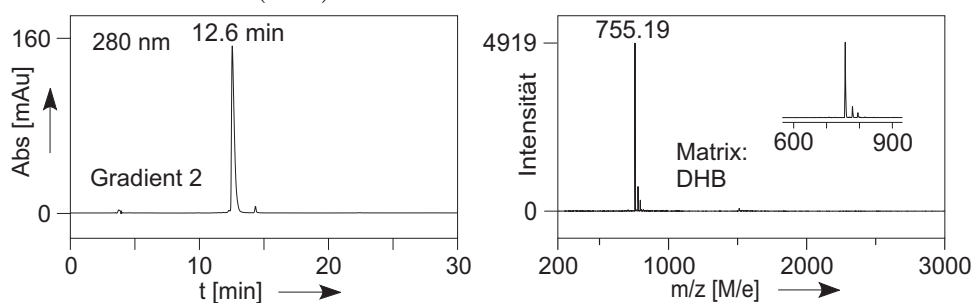


H-LYKAGGRAEYS-OH (149)

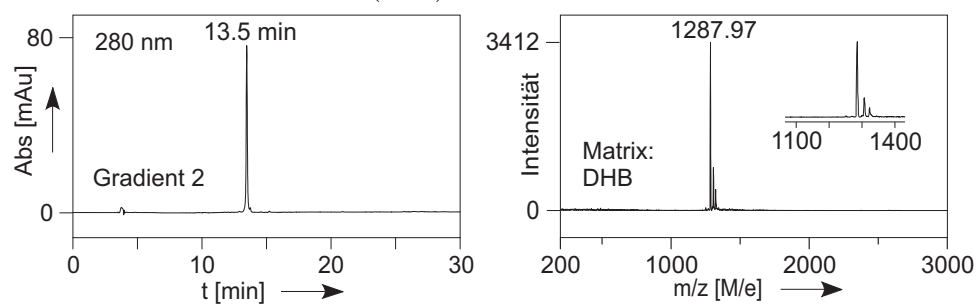


2.3 Peptide aus Kapitel 4.2: Native chemische Verknüpfung mit Valin

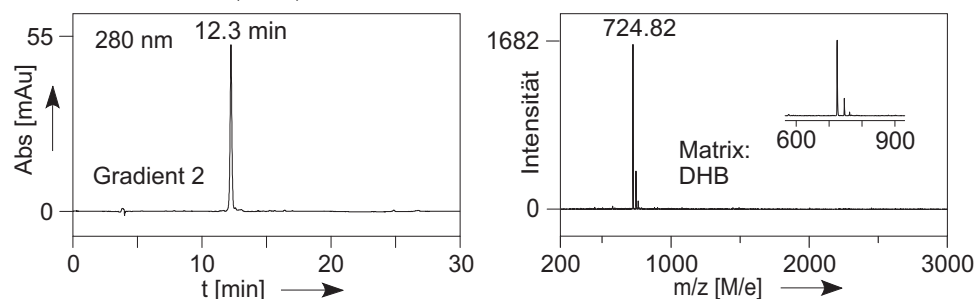
H-PenRAEYS-NH₂ (152)



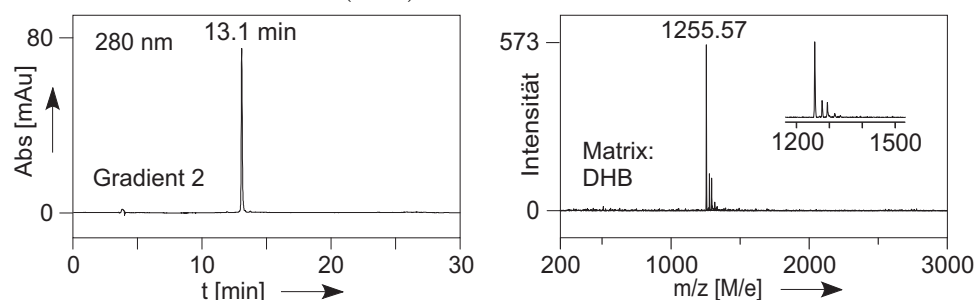
H-LYKAGPenRAEYS-NH₂ (**154**)



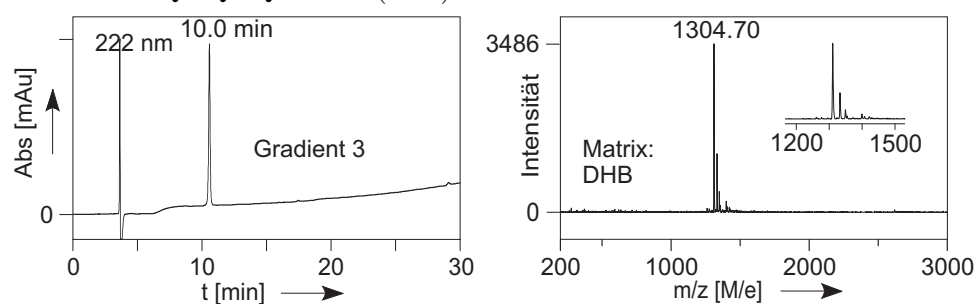
H-VRAEYS-NH₂ (**159**)



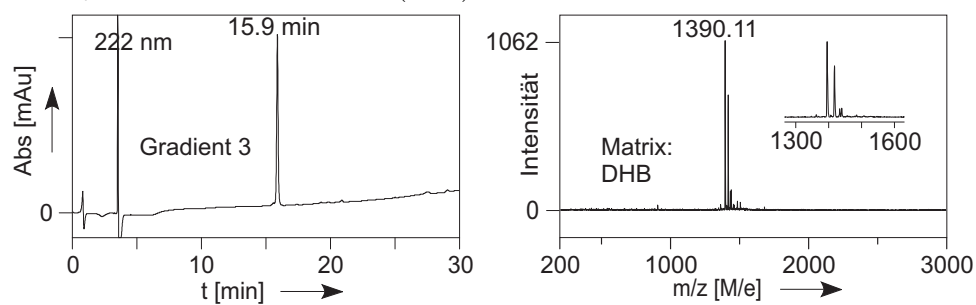
H-LYKAGVRAEYS-NH₂ (**160**)



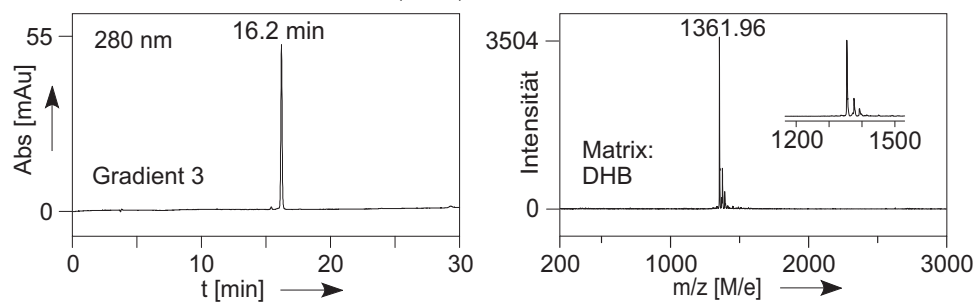
H-PenAKSDQKQEQL-NH₂ (**162**)



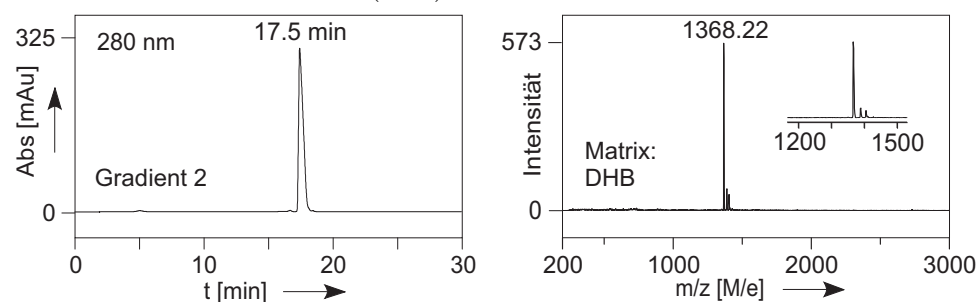
H-PenQPKTGPFDLK-NH₂ (**163**)



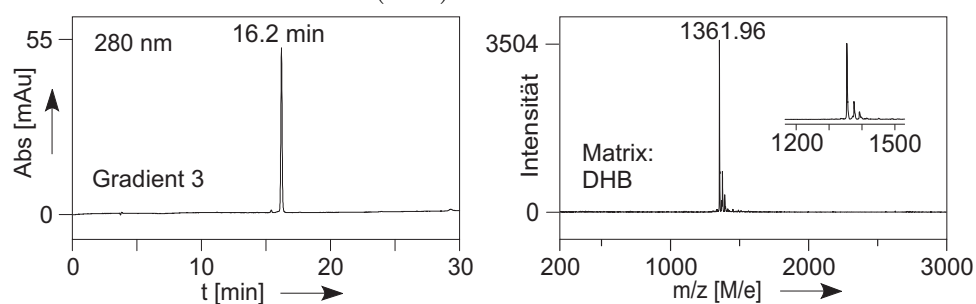
H-LYKA α MPenRAEYS-NH₂ (**169**)



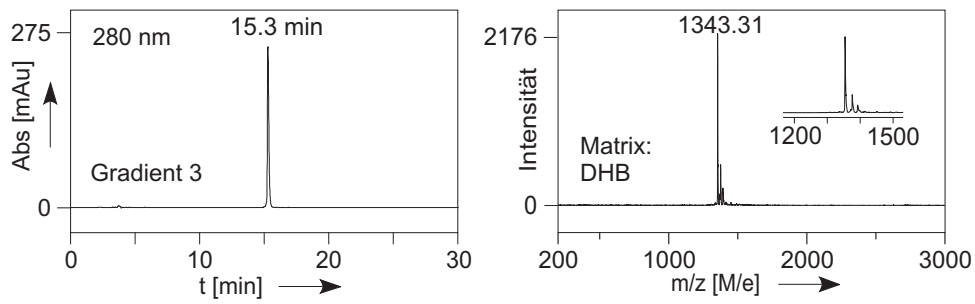
H-LYKAHPenRAEYS-NH₂ (**172**)



H-LYKAMPenRAEYS-NH₂ (**176**)

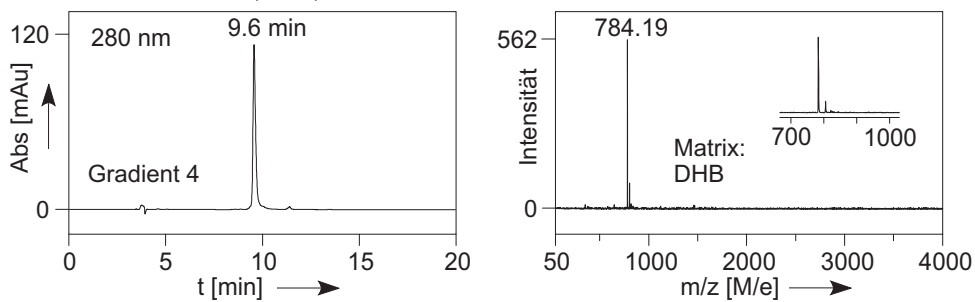


H-LYKALPenRAEYS-NH₂ (179)

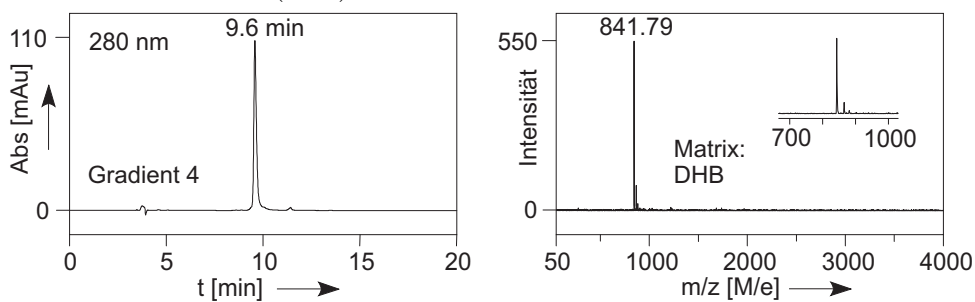


2.4 Peptide aus Kapitel 4.3: Ligation mit internem Cystein

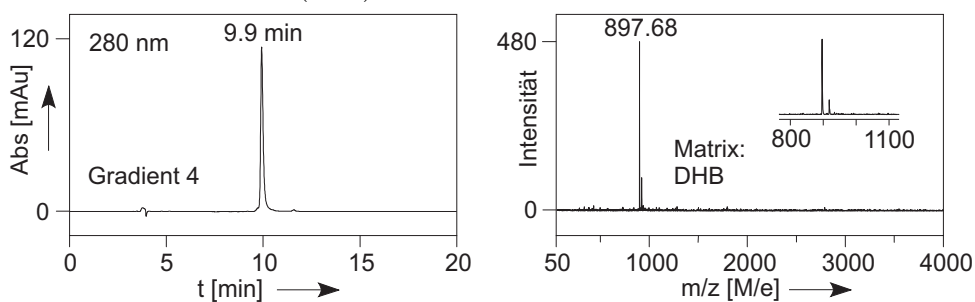
H-GCRAEYS-NH₂ (195)



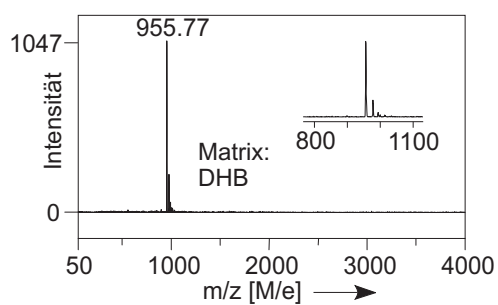
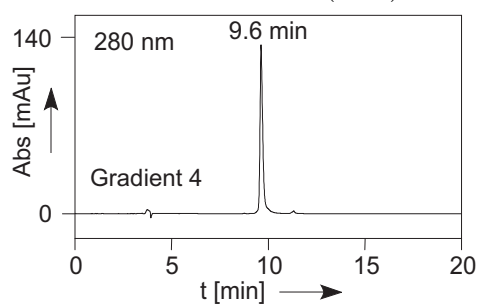
H-GGCRAEYS-NH₂ (196)



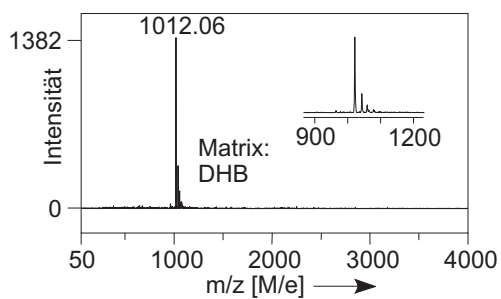
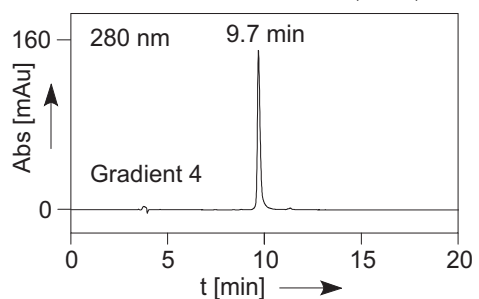
H-GGGCRAEYS-NH₂ (197)



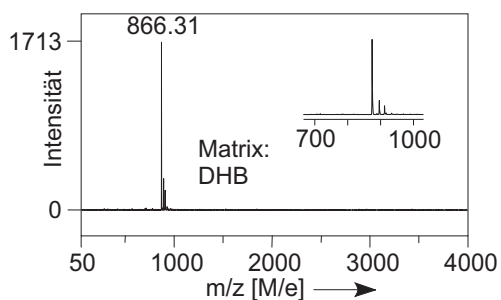
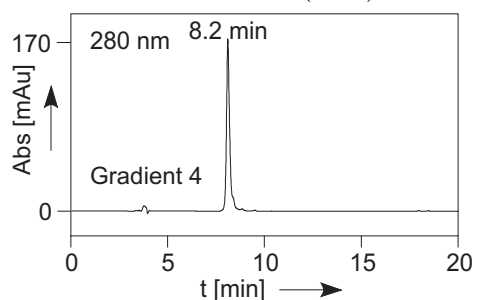
H-GGGGCRAEYS-NH₂ (**198**)



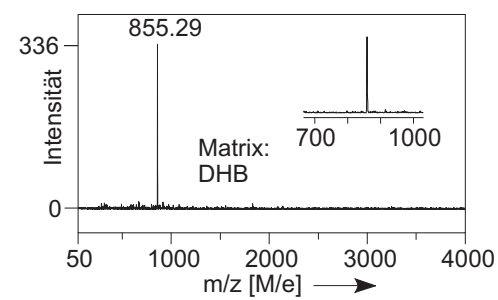
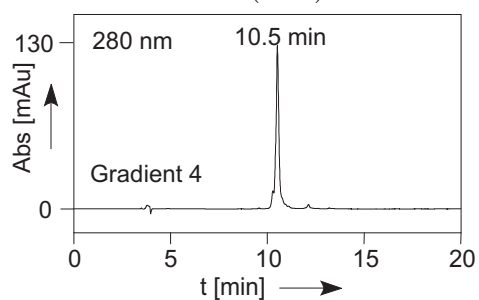
H-GGGGCRAEYS-NH₂ (**199**)



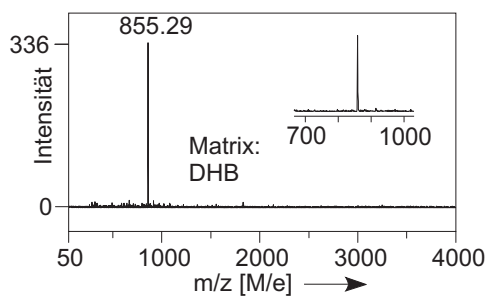
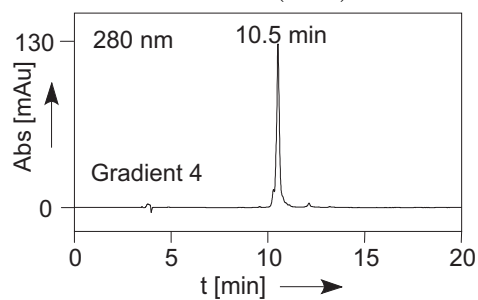
H-GGGARA EYS-NH₂ (**200**)



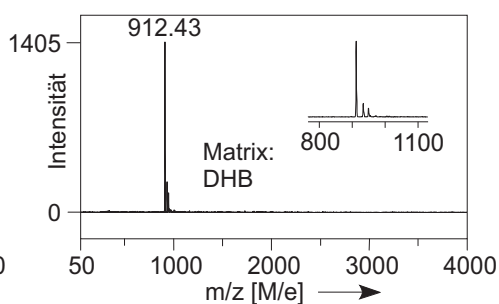
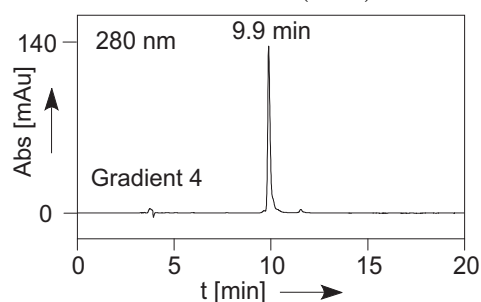
H-ACRAEYS-NH₂ (**201**)



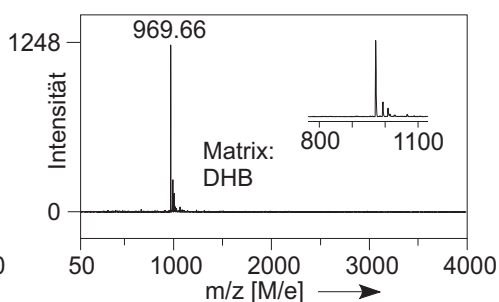
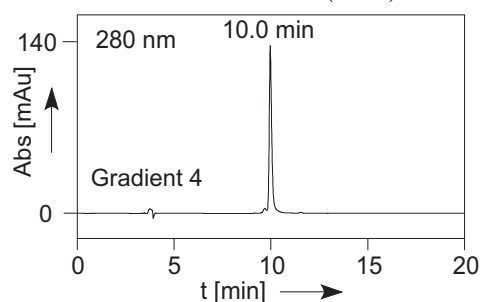
H-AGCRAEYS-NH₂ (**202**)



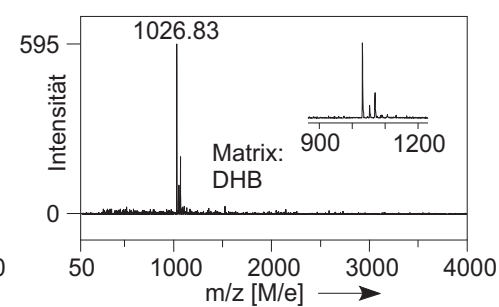
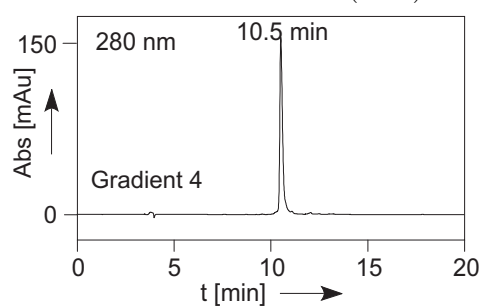
H-AGGCRAEYS-NH₂ (**203**)



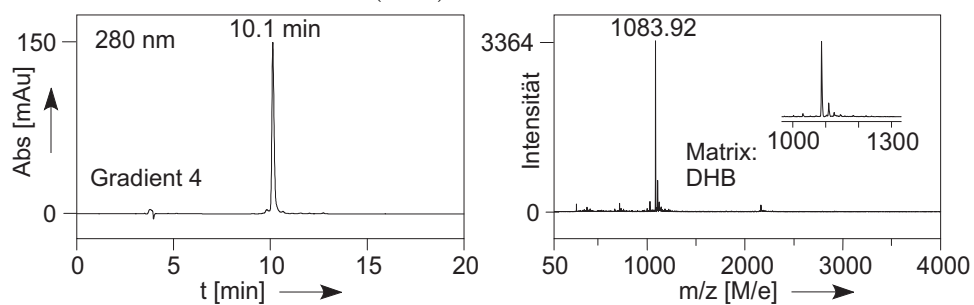
H-AGGGCRAEYS-NH₂ (**204**)



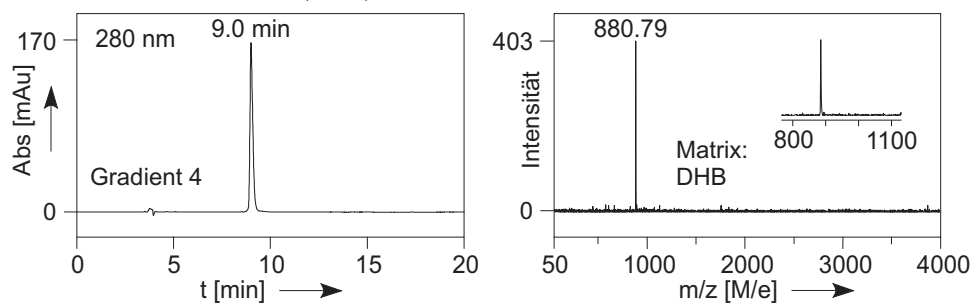
H-AGGGGCRAEYS-NH₂ (**205**)



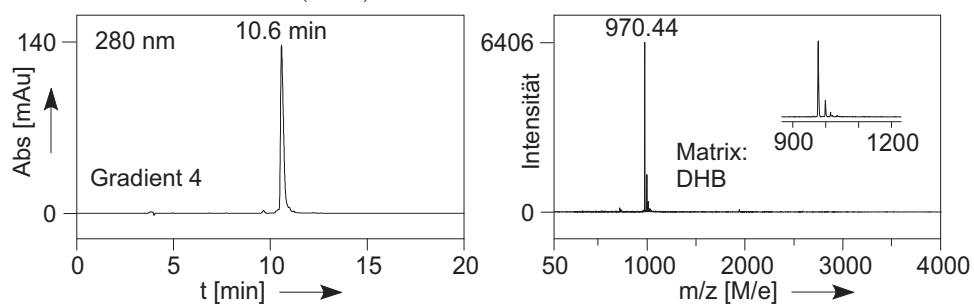
H-AGGGGGCRAEYS-NH₂ (**206**)



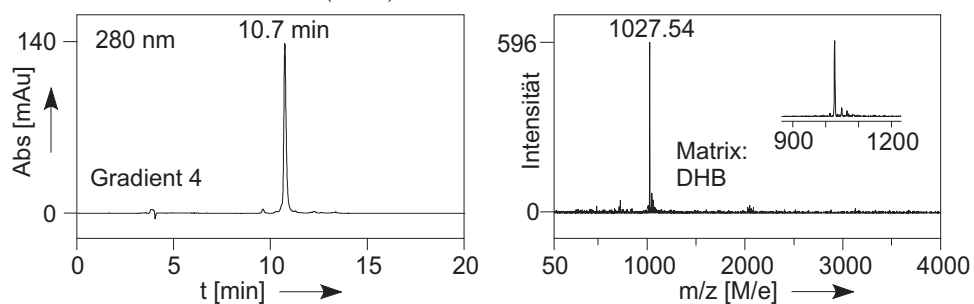
H-AGGARAEYS-NH₂ (**207**)



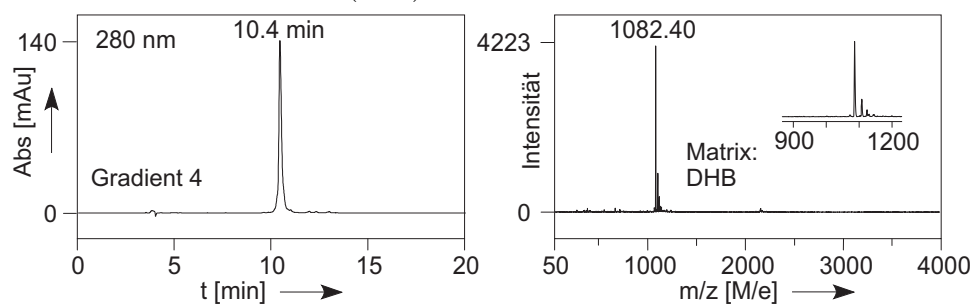
H-AGDCRAEYS-NH₂ (**208**)



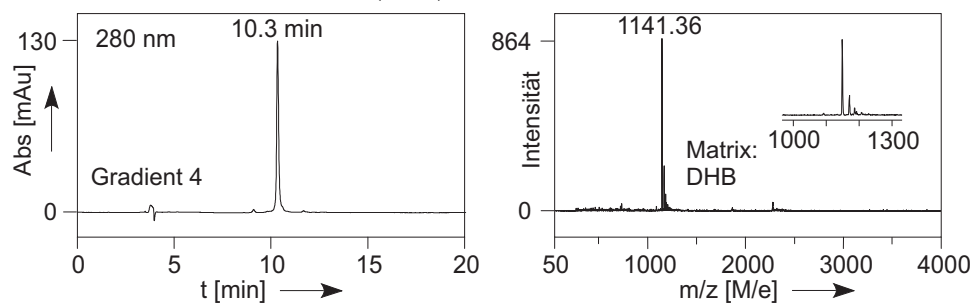
H-AGGDCRAEYS-NH₂ (**209**)



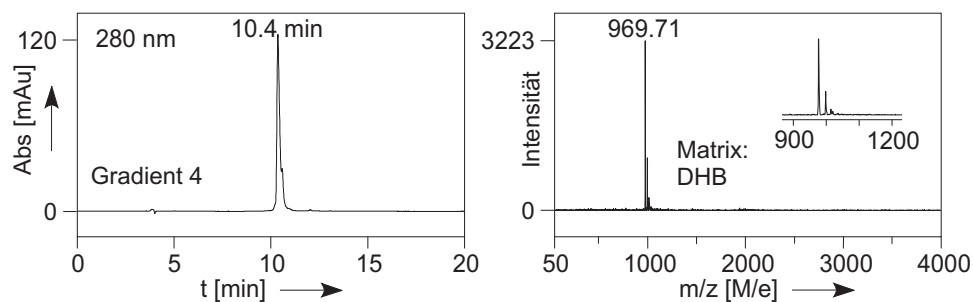
H-AGGGDCRAEYS-NH₂ (**210**)



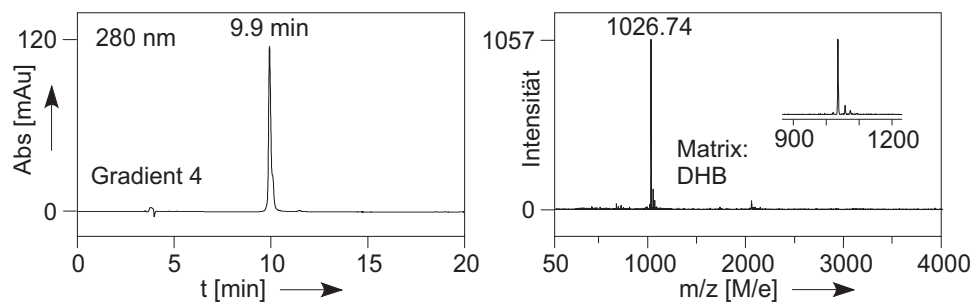
H-AGGGGDCRAEYS-NH₂ (**211**)



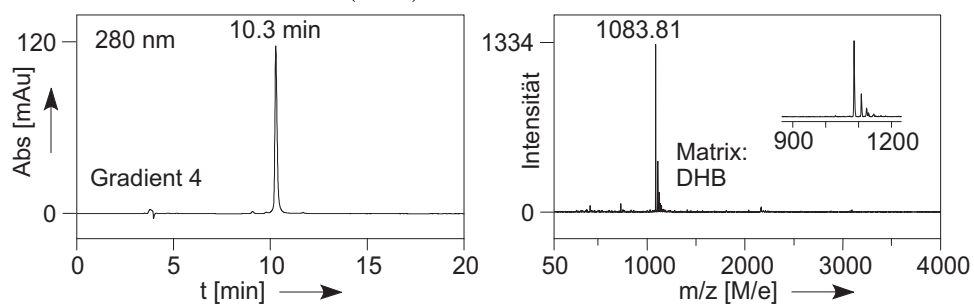
H-AGNCRAEYS-NH₂ (**212**)



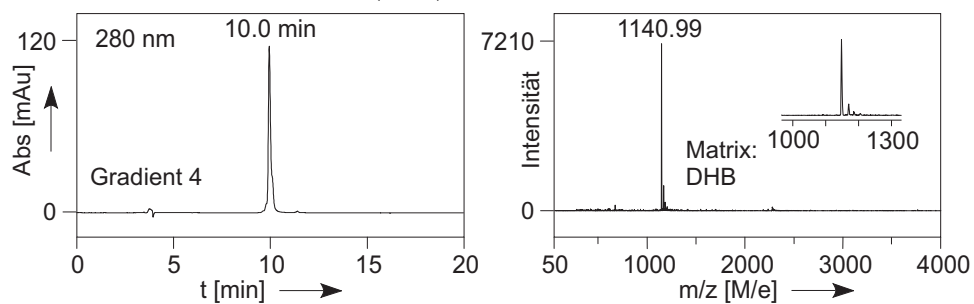
H-AGGNCRAEYS-NH₂ (**213**)



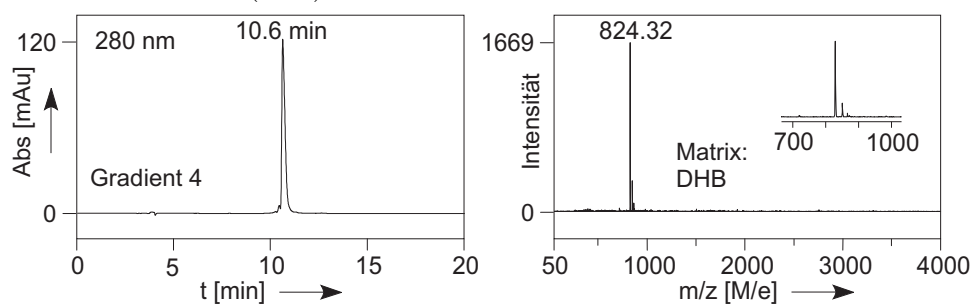
H-AGGGNCRAEYS-NH₂ (**214**)



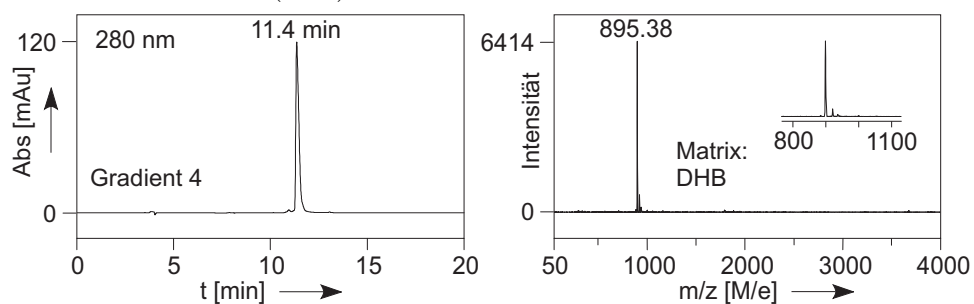
H-AGGGGNCRAEYS-NH₂ (**215**)



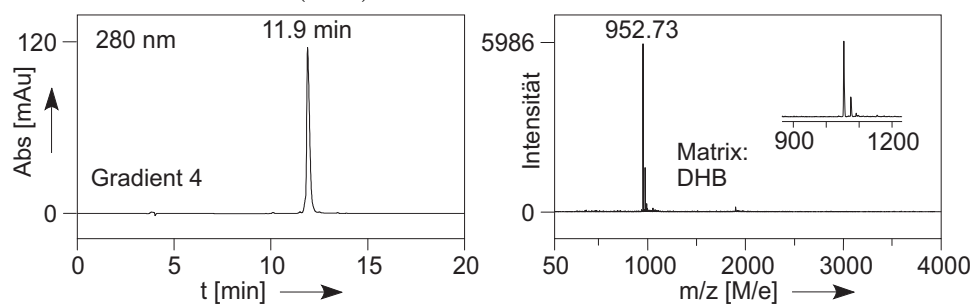
H-PCRAEYS-NH₂ (**216**)



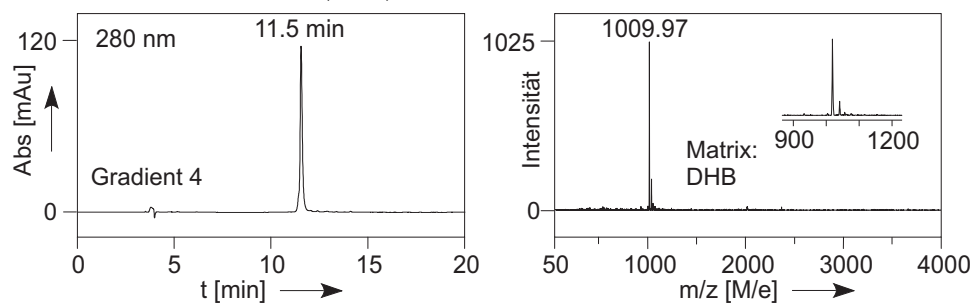
H-APCRAEYS-NH₂ (**217**)



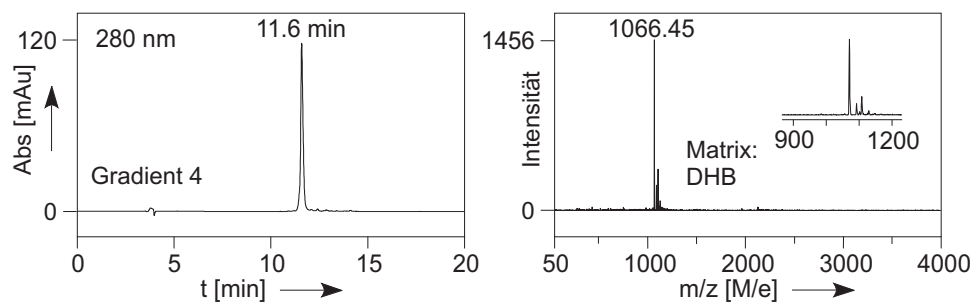
H-AGPCRAEYS-NH₂ (**218**)



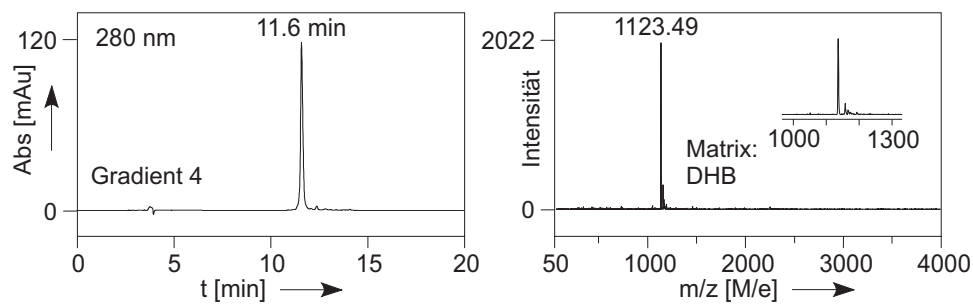
H-AGGPCRAEYS-NH₂ (**219**)



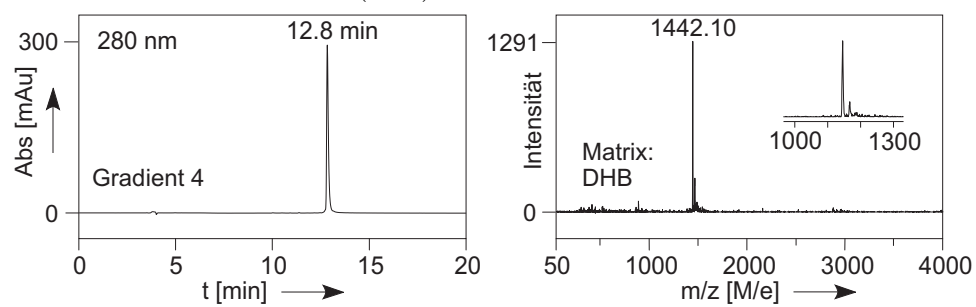
H-AGGGPCRAEYS-NH₂ (**220**)



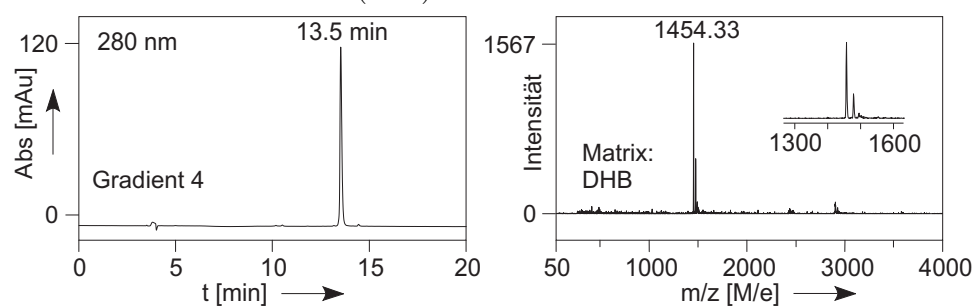
H-AGGGGPCRAEYS-NH₂ (**221**)



H-DYYDCRVEHWG-NH₂ (**222**)



H-KHSDCLLFYNKS-NH₂ (**223**)



Abkürzungsverzeichnis

Für die Bezeichnung der Aminosäuren in Peptidsequenzen wurde der 1-Buchstaben-Code verwendet.[71]

AA	Aminosäure(n)
Aag	Amidauxiliarglycin
Ac	Acetyl
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
äq	Äquivalent(e)
AS	Ameisensäure
AU	<i>Absorbance Units</i> (dt. Absorptionseinheiten)
Bn, Bzl	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
ESI	Elektrospray Ionisierung
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	Glutathion
HCTU	O-(6-Chlor-1-hydrocibenzotriazol-1-yl)- -1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
MALDI/TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation - Time of Flight</i>
MBHA	4-Methylbenzhydramin
Me	Methyl
MESA	Mercaptoethansulfonsäure
MES-Na	Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz
MS	Massenspektrometrie
Nag	Nitrilauxiliarglycin
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAA	Propionsäureamid
PAAG	Propionsäureamid-Glycin
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pen	Penicillamin
PG	<i>protecting group</i> (dt. Schutzgruppe)
Ph	Phenyl
PyBOP	(1H-Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdedocylsulfate
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TA	Thioanisol
Tag	Thiolactonauxiliarglycin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Triscarboxyethylenphosphan
TCTU	O-(6-Chlor-1-hydrocibenzotriazol-1-yl)- -1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
TGR	Tentagel Resin
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropyl
<i>t_R</i>	Retentionszeit
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)

VA-044	2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid
Vol-%	Volumenprozent
Z	Benzyloxycarbonyl

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Oliver Seitz für seine fortwährende Unterstützung danken. Die vielen konstruktiven und auch kritischen Diskussionen haben meine Fähigkeit wissenschaftliche Zusammenhänge zu hinterfragen entscheidend geprägt. Darüber hinaus eröffnete er mir Möglichkeiten an internationalen Kongressen und einem überaus eindrucksvollen Forschungsaufenthalt in China teilzunehmen. Ich danke ihm für seine alles andere als selbstverständliche Nachsicht über die Stunden, die ich in glücklichen aber auch in schweren Zeiten meiner Familie und nicht meiner Arbeit widmete.

Franziska Mende, Lucas Bethge, Dr. Christian Bürgel und Dr. Tom N. Großmann haben mir als Erstkorrektoren dieser Arbeit durch ihre schnelle Arbeit und die zahlreichen, nützlichen Bemerkungen und Anregungen eine erstklassige Hilfestellung geboten. Für die ununterbrochen angenehme Arbeitsatmosphäre in meinem Labor danke ich Dr. Tom N. Großmann, Lucas Bethge, Anne Erben, Julia Michaelis und Anne Strohbach. Die Zeit mit ihnen im Labor wird für mich immer als Maßstab für ein vollkommenes Miteinander am Arbeitsplatz gelten. Darüber hinaus möchte ich Dr. Simon Ficht, Dr. Christian Dose und Dr. Lars Röglin für ihre Unterstützung in Form helfender Hinweise und nützlicher Diskussionen besonders in der Anfangsphase meiner Doktorarbeit danken. Meinen Mitstreitern auf dem Gebiet der Peptidchemie Franziska Mende und Heike Rohde danke ich für den Erfahrungsaustausch und die großartige Zusammenarbeit. Besonderen Dank für ihre Unterstützung im Projekt zur *Nativen chemischen Ligation an Valin* möchte ich Heike Rohde aussprechen. An dieser Stelle danke ich auch Dr. Stefan Pieper. Er stellte den Synthesebaustein bereit, der die Durchführung dieses Projektes überhaupt erst ermöglichte. Außerdem danke ich meinen überaus engagierten Forschungspraktikantinnen Skadi Kull, Inga Pfeffer und Susanne Lischka.

Meinen Eltern möchte ich für ihre fortwährende Unterstützung danken.

Meiner Frau Andrea Schmidt danke ich für ihre Geduld und ihre Unterstützung. Ich danke ihr dafür, dass sie trotz all der Entbehrungen und Widrigkeiten, die meine Promotion mit sich brachte, zu mir gehalten hat. Meinen Kindern, denen diese Arbeit gewidmet ist, danke ich für die turbulente Abwechslung. Ihr Lachen und die unzähligen Begebenheiten, die mich zum Schmunzeln brachten und die für jede schlaflose Nacht entschädigten, versüßten mir die Zeit sehr.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 28.01.2008

Christian Haase